

**Posttranslationale Modifikationen rekombinanter Proteine in  
Baculovirus-infizierten Insektenzellen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)

genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von  
**Norbert Schulze**  
aus Berlin

Referent: Priv.-Doz. Dr. R. Wagner

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. S. Lang

eingereicht am 15.02.2001

Disputation: 08.05.2001

Prüfungsvorsitzender: Prof. U. Panten  
weitere Prüfer: Priv.-Doz. Dr. R. Wagner  
Priv.-Doz. Dr. C. Thöne

Datum der Veröffentlichung: September 2001

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### *Publikationen*

Schulze, N., Albers, U., Grabenhorst, E., Conradt, H.S., Rohde, M., Nimtz, M., Jäger, V. (1999) Intracellular localization of non-secreted recombinant  $\beta$ -trace protein in vesicle-like structures of baculovirus-infected insect cells. In: Animal cell technology: Products from cells, cells as products. Bernard, A., Griffith, B., Noé, W., Wurm, F. (Hrsg), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 123-125

### *Tagungsbeiträge*

Schulze, N., Rodriguez, G., Rohde, M., Grabenhorst, E., Conradt, H.S., Jäger, V. (1998) Localization and characterization of intracellularly accumulated  $\beta$ -trace protein produced in baculovirus-infected insect cells.

Poster im Rahmen des Internationalen GlycoBioTechnology Symposium in Braunschweig

Schulze, N., Henninger, H., Grabenhorst, E., Conradt, H.S., Jäger, V. Intracellular localization and characterization of incorrectly processed recombinant proteins in baculovirus-infected insect cell.

Vortrag im Rahmen der Cell Culture Engineering Conference VII, February 5-10, 2000 in Santa Fe, NM, USA

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1997 bis Juli 2000 in der Abteilung Zellkulturtechnik im Bereich Bioverfahrenstechnik der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) unter wissenschaftlicher Betreuung von Herrn Dr. V. Jäger durchgeführt, dem ich hiermit für die gute Betreuung und die zahlreichen Anregungen, die diese Arbeit bereichert haben, danken möchte.

Bei Herrn Dr. R. Wagner und Herrn Dr. S. Lang möchte ich mich für die Übernahme der Referate und die Vertretung dieser Arbeit vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät der TU Braunschweig bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H.S. Conradt und Herrn Dr. E. Grabenhorst, die durch ihre stete Diskussionsbereitschaft und die vielen Hilfestellungen sehr viel zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Rohde sowie bei Frau E. Müller für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bedanken. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. M. Rohde für seine ständige Diskussionsbereitschaft und der Einführung in die Techniken der Immunfluoreszenz und der Elektronenmikroskopie danken.

Herrn Dr. M. Nimtz danke ich für die Einarbeitung in die Auswertung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Desweiteren möchte ich Herrn U. Albers und Herrn H. Henninger danken, die im Rahmen ihrer Studien- bzw. Diplomarbeit die Techniken für die Immunfluoreszenz etabliert bzw. N-Glycan-Untersuchungen durchgeführt haben.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern der Abteilung Zellkulturtechnik für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Besonders möchte ich Frau Anja Kobold für die Durchführung der Plaque-Assays und Frau K. Anastassiadis für die Einarbeitung in die Gelpermeationschromatographie danken. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn C. Priesner für die umfangreiche Hilfestellung von Herrn H. Henninger bezüglich der Einarbeitung in die Techniken der 2D-Gelelektrophorese und für die zahlreichen Diskussionen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn C. Schulz danke ich für die Durchsicht des Manuskripts.

Bei Frau S. Pohl möchte ich mich für die Einarbeitung in die N-Glycan-Analyse bedanken. Mein Dank gilt weiterhin Frau A. Tiephold und Frau E. Surges für die Durchführung der MALDI/TOF-MS,- ESI-MS- und ESI-MS-MS-Analysen. Weiterhin möchte ich Frau R. Getzlaff für die Proteinsequenzierung danken.

Der Friedrich Naumann Stiftung danke ich für die Gewährung eines Stipendiums und namentlich Herrn Dr. F.W. Hecker für die Betreuung am Hochschulort. Der GBF danke ich für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium und somit diese Arbeit ermöglicht haben. Meiner Martina möchte ich für ihre großartige Unterstützung und ihr Verständnis, das sie mir während dieser Jahre entgegengebracht hat, danken.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen und Symbole.....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Geschichte und Entwicklung des Baculovirus-Expressionssystems.....	2
1.2. Baculoviren.....	4
1.3. Pathologie und Baculovirus-Expressions-Konzept.....	5
1.4. Insektenzellen als Wirt für die Expression rekombinanter Proteine.....	9
1.5. Herstellung rekombinanter Proteine mit dem Baculovirus-Expressionssystem....	10
1.6. Biosynthese von sekretorischen Proteinen.....	12
1.6.1. Signalpeptidabspaltung.....	14
1.6.2. Bildung von Disulfidbrücken.....	16
1.6.3. Proteinglycosylierung.....	17
1.7. Das Modellprotein $\beta$ -trace Protein ( $\beta$ -TP).....	25
1.8. Problem und Zielsetzung der Arbeit.....	26
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.1. Zelllinien und Virus.....	29
2.1.1. IPLB-Sf21AE (Sf21).....	29
2.1.2. Sf9.....	29
2.1.3. BTI Tn5B1-4 ( <i>High Five</i> <sup>TM</sup> ).....	29
2.1.4. AcMNPV- $\beta$ -TP.....	29
2.2. Medien und Mediensupplemente.....	29
2.2.1. T-Ex-Cell 401 (TEX).....	30
2.2.2. TC100/TB + 10% FCS.....	30
2.2.3. MMEM (MES-gepuffertes MEM).....	30
2.2.4. Fötales Kälberserum (FCS).....	31
2.3. Revitalisieren von Zellen.....	31
2.4. Kultivierung von Insektenzellen.....	31
2.4.1. Suspensionskultur.....	31
2.4.2. Adhärenzte Kultur.....	32
2.4.3. Infektion von Insektenzellen.....	33
2.4.4. Herstellung des Virusstocks.....	33
2.4.5. Radioaktive Markierung von Baculovirus-infizierten Insektenzellen.....	34
2.5. Prozeßanalytik.....	35
2.5.1. Bestimmung der Zellzahl.....	35
2.5.2. Quantitative Bestimmung von Glucose und Lactat.....	35
2.5.3. Quantitative Bestimmung freier Aminosäuren.....	35
2.5.4. Bestimmung des Virus-Titers mittels Plaque-Assay.....	36
2.6. Zellaufschluß.....	37
2.7. Konzentrierung von Proteinen.....	37
2.7.1. Speed Vac Concentrator.....	37
2.7.2. Ultrazentrifugation.....	37
2.7.3. Ultrafiltration.....	38
2.7.4. Ethanolfällung.....	38
2.7.5. Trichloressigsäurefällung (TCA-Fällung).....	38
2.7.6. Immunpräzipitation.....	38

2.7.7. Chloroform-Methanol-Extraktion.....	39
2.8. Gelpermeationschromatographie.....	39
2.9. Affinitätschromatographie.....	40
2.10. Entsalzung.....	41
2.10.1. Entsalzung von Proteinen durch Dialyse.....	41
2.10.2. Entsalzung und Reinigung von Peptiden mit RP-18-Kartuschen.....	42
2.10.3. Entsalzung von N-Glycanen.....	42
2.11. Denaturierung, Reduktion, Carboxamidomethylierung und tryptische Spaltung von Proteinen.....	43
2.11.1. Denaturierung.....	43
2.11.2. Reduktion.....	43
2.11.3. Carboxamidomethylierung.....	43
2.11.4. Tryptischer Verdau.....	44
2.12. Arbeiten unter Stickstoff.....	44
2.13. Enzymatische Freisetzung und Isolierung von N-Glycanen.....	45
2.14. Produktcharakterisierung.....	45
2.14.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
2.14.1.1. Färbung der Gele.....	47
2.14.1.2. Autoradiographie von radioaktiv markierten Proteinen im Gel.....	48
2.14.2. <i>Semi-dry blotting</i> und Detektion der Proteine.....	48
2.14.2.1. Immunochemischer Nachweis des $\beta$ -TP-Proteins auf Nitrocellulosemembranen.....	49
2.14.2.2. Färbung von PVDF-Membranen mit Coomassie R-250.....	50
2.14.3. Tryptisches mapping vor und nach PNGase-F-Verdau.....	50
2.14.4. Proteinsequenzierung.....	50
2.14.5. MALDI/TOF-MS.....	51
2.14.6. ESI-MS.....	52
2.14.7. Analytische Trennung von Glycanen durch HPAEC-PAD.....	52
2.15. Immunocytochemie.....	53
2.15.1. Immunfluoreszenzmikroskopie.....	53
2.15.1.1. Immunomarkierung des $\beta$ -TP.....	54
2.15.1.2. Diamino-2-phenylindol (DAPI)-Färbung.....	55
2.15.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	55
<b>3. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>57</b>
3.1. Akkumulation des Modellproteins $\beta$ -trace Protein ( $\beta$ -TP) in Insektenzellen.....	57
3.2. Immunolokalisierung des intrazellulären $\beta$ -TP in Insektenzellen.....	58
3.2.1. Immunolokalisierung des intrazellulären $\beta$ -TP durch Immunfluoreszenz.....	58
3.2.2. Elektronenmikroskopische Charakterisierung nicht infizierter und infizierter Insektenzellen und Immunolokalisierung des intrazellulären $\beta$ -TP.....	64
3.3. Biosynthese und Sekretion des $\beta$ -TP in Baculovirus-infizierten Insektenzellen.....	75
3.3.1. Charakterisierung des intra- und extrazellulären $\beta$ -TP in Insektenzellen.....	75
3.3.2. Einfluß von Glycosylierungsinhibitoren auf das intrazellulär akkumulierte $\beta$ -TP.....	79
3.3.3. Einfluß von Proteasen auf die Integrität des intrazellulären $\beta$ -TP.....	82
3.3.4. Kinetik der Produktbildung von $\beta$ -TP in infizierten Insektenzellen.....	84
3.3.4.1. Untersuchung der Produktbildung des $\beta$ -TP durch <i>western blotting</i> .....	84
3.3.4.2. Biosynthese und konstitutive Sekretion von $\beta$ -TP in infizierten Insekten- zellen.....	87

3.4. Analyse der ko- und posttranslationalen Modifikationen des intra- und extrazellulären $\beta$ -TP aus infizierten Insektenzellen.....	95
3.4.1. Reinigung des intrazellulären $\beta$ -TP aus infizierten Insektenzellen.....	96
3.4.2. Signalpeptidabspaltung.....	98
3.4.3. Strategie, Isolierung und Charakterisierung der N-Glycane des $\beta$ -TP in Baculovirus-infizierten Insektenzellen.....	101
3.4.4. Analyse der nicht glycosylierten Proteinformen.....	104
3.4.5. N-Glycane des $\beta$ -TP aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen.....	105
3.4.6. Inhibierung der Mannosidase II durch Swainsonin.....	110
3.4.7. Degradation des $\beta$ -TP in Insektenzellen.....	116
3.4.8. Analyse der N-Glycane des $\beta$ -TP in der Übergangsphase (20 h p.i.).....	119
3.4.9. Disulfidbrückenanalytik.....	122
3.4.9.1. Strategie der Disulfidbrückenanalytik.....	122
3.4.9.2. Analyse des Thiol/Disulfidbrückenstatus des extrazellulären $\beta$ -TPs.....	124
3.4.9.3. Analyse des intrazellulären Thiol/Disulfidbrückenstatus des $\beta$ -TPs.....	131
3.4.10. Zelleigene N-Glycanstrukturen infizierter und nicht infizierter Sf21 Zellen.....	136
<b>4. Allgemeine Diskussion.....</b>	<b>142</b>
4.1. Mikroskopische Untersuchungen der intrazellulären Kompartimentierung nicht infizierter und infizierter Insektenzellen und Kinetik der Produktbildung des $\beta$ -TPs.....	144
4.2. Biosynthese und Sekretion des $\beta$ -TP in Insektenzellen.....	147
4.3. Lokalisierung und Isolierung des $\beta$ -TP in zellulären Fraktionen.....	151
4.4. Signalpeptidabspaltung.....	153
4.5. Thiol/Disulfidbrückenstatus.....	155
4.6. Proteinglycosylierung.....	156
4.6.1. Glycosylierungskapazität von Insektenzellen.....	157
4.6.2. Analyse der intrazellulären N-Glycane des $\beta$ -TP aus Insektenzellen.....	159
4.6.3. Prozessierung der Glycane von $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ zu $\text{Man}_{2-3}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$ in infizierten Insektenzellen.....	162
4.6.4. Beteiligung der Proteinqualitätskontrolle an der Akkumulation des $\beta$ -TP.....	165
4.6.5. Zelleigene Gesamtoligosaccharidstrukturen infizierter und nicht infizierter Insektenzellen.....	166
4.7. Zusammenfassung und Ausblick.....	167
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>171</b>
<b>6. Anhang.....</b>	<b>191</b>

## Abkürzungen

AcMNPV	<i>Autographa californica</i> multiple nuclear polyhedrosis virus
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BHK	Baby hamster kidney
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumin
BTI Tn5B1-4	Zellinie aus <i>Trichoplusia ni</i> (High Five)
BV	Budded virus
CHO	Chinese hamster ovary
CID	Collision induced dissociation
cpm	Counts per minute
CSF	Cerebrospinale Flüssigkeit
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythrol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
FCS	Fetal calf serum
FPLC	Fast protein liquid chromatography
Fuc	L-Fucose (6-Desoxy-L-galactose)
Gal	D-Galactose
Glc	D-Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamin
HPAEC	High-pH anion-exchange chromatography
hpi	Hours post infection
HPLC	High pressure liquid chromatography
IgG	Immunoglobulin G
IL2	Interleukin 2
IPLB-SF21AE	Zelllinie aus <i>Spodoptera frugiperda</i>
Lex	Lewis <sup>x</sup>
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionisation
Man	D-Mannose
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOI	Multiplicity of infection
MS	Massenspektrometrie
MS-MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NeuAc	N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
N <sub>x</sub>	Glycosylierungsstelle
ODV	Occluded derived virus
PAD	Pulsed amperometric detection
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-buffered saline

PFU	Plaque forming units
pI	Isoelektrischer Punkt
PNGase	Peptid-N <sup>4</sup> -(N-acetyl-~glucosaminy)-asparagin-amidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sf9	Subklon der Zelllinie IPLB-Sf21AE
sLex	SialylLewis <sup>x</sup>
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time of flight
t-PA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
TPCK	L-1-Chlor-3-tosylamido-4-phenyl-2-butanon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

### Ein- und Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure

Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit die gängigen Abkürzungen benutzt, die auch in einer Vielzahl von Lehrbüchern verwendet werden.

## 1. Einleitung

Die Etablierung der DNA-Rekombinationstechnik (Gentechnik) in den frühen siebziger Jahren war die Schlüsselentwicklung für die heutige moderne Biotechnologie. Den Grundstein dafür legten Cohen et al. (1973) mit ihrer Arbeit zur Transformation des Darmbakterium *E.coli*. Ab diesem Zeitpunkt war man nun nicht mehr nur auf natürliche Produkte von Mikroorganismen, wie Antibiotika aus Bakterien und Pilzen, angewiesen, sondern konnte gezielt Proteine generieren. Das erste menschliche Protein, das in *E.coli* hergestellt wurde, war das Peptidhormon Somatostatin, ein Antiwachstumshormon, das für die Behandlung von Wachstumsstörungen eingesetzt wurde (Itakura et al., 1977). Als erstes rekombinantes Medikament aus diesem Wirt kam das Insulin 1982 auf den Markt. Wegen seiner guten Ausbeuten, der hohen Wachstumsraten und der relativ einfachen Handhabung ist die Synthese mittels transfizierter Bakterien bei solch „einfachen“ Proteinen auch heute noch die Methode der Wahl. Prokaryoten sind aber nicht in der Lage, Proteine posttranslational komplex zu modifizieren. Aus diesem Grund wurden intensive Anstrengungen unternommen, um die Methoden der DNA-Rekombinationstechnik auf eukaryotische Zellen auszuweiten. Heute stehen eine Vielzahl von Expressionssystemen zur Verfügung. Neben stabil transfizierten Säugerzelllinien wurden in den letzten Jahren für die Produktion rekombinanter Proteine einige auf tierpathogenen Viren beruhende Expressionssysteme eingesetzt (Mizrahi, 1986, Blohm et al., 1988, Wirth und Hauser, 1993). Ein zu der letztgenannten Gruppe gehörendes System ist das Baculovirus-Expressionssystem, das besonders attraktiv für die schnelle Herstellung von größeren Mengen (mehrere hundert mg) an einem gewünschten rekombinanten Protein ist. Ein häufig beobachtetes Problem bei der Expression konstitutiv sekretorischer rekombinanter Proteine liegt in der intrazellulären Akkumulation des gewünschten rekombinanten Produktes, das mit der Bildung von *inclusion bodies* in *E. coli* vergleichbar ist. Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit den Ursachen, die zu der Entstehung dieses Akkumulationsphänomens bei der Expression rekombinanter sekretorischer Proteine in Insektenzellen mit Hilfe rekombinanter Baculoviren führen.

### 1.1. Geschichte und Entwicklung des Baculovirus-Expressionssystems

Die erste Erwähnung der Wirkung von Baculoviren geht auf antike chinesische Schriften über die Kultur von Seidenraupen zurück, in der die Liquefaktion der Seidenraupen beschrieben ist. In der westlichen Literatur datiert die erste Beschreibung einer „Baculovirusinfektion“ aus dem 16. Jahrhundert aus einer Schrift des italienischen Bischofs Vida (Benz, 1986). Seit dieser Zeit ist der Verlauf der Baculovirusinfektion, der morphologisch durch die pathologischen Veränderungen der Raupen bis zu deren Lyse gekennzeichnet ist, bekannt. So ist von abstoßend verfault riechenden Sekreten die Rede, die aus dem Körper der Seidenraupen bei deren Liquefaktion abgesondert werden. In der Baculovirus Pathogenese wird dieser Prozeß heute als *melting*- oder *wilting* bezeichnet.

Erste Erkenntnisse über mögliche Ursachen dieses Prozesses wurden aber erst im 19. Jahrhundert erhalten, als es gelang, in den abgesonderten Sekreten durch Lichtmikroskopie polyedrische Kristalle der lysierenden Raupen zu identifizieren und diese mit dem *melting* bzw. *wilting* zu korrelieren (Benz, 1986). In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts setzte sich die Ansicht durch, daß sich in diesen polyedrischen Kristallen Viruspartikel befinden und Baculoviren eine bedeutende Rolle bei der natürlichen Kontrolle von Insektenpopulationen spielen. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen entdeckte Bergold in den dreißiger und vierziger Jahren des letzten Jahrhunderts stäbchenartige Virionen innerhalb der kristallinen Körper und veröffentlichte seine als Meilensteine in der Baculovirus-Forschung angesehenen Ergebnisse über die biochemischen Eigenschaften der NPVs (Nuclear Polyhedrosis Virion) (Bergold, 1953). Während dieser Zeit wurde von Balch und Bird (1944) beobachtet, daß sich Baculoviren sehr effektiv als biologische Agenzien zur Schädlingsbekämpfung einsetzen lassen. Die Nutzung von Baculoviren als biologische Insektizide konnte sich aber aufgrund der wesentlich billigeren chemischen Insektizide und der Zeit von 5 - 15 Tagen, die von der Infektion bis zum Tod des Schädlings vergeht (Wood, 1995), nicht durchsetzen.

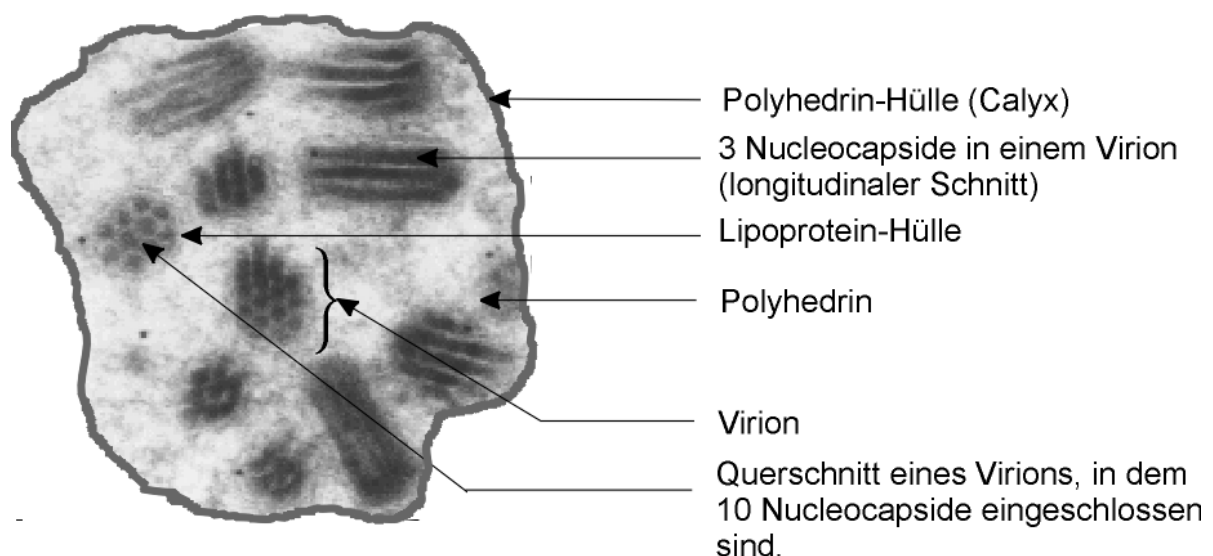
Von 1970 bis 1985 wurden verschiedene bedeutende Fortschritte bei der Erforschung

der Pathologie und der Genetik von Baculoviren erreicht. So war die Erkenntnis, daß zwei verschiedene Formen von Baculoviren, die *Budded Viren* (BV) und die *occlusion derived Viren* (ODV), existieren, ein entscheidender Meilenstein für das Verständnis der Mechanismen der Viruspathogenese in Zellkultur sowie im Insektenwirt (Frederici, 1997). Wie sich dabei zeigte, sind die ODVs nur im Mitteldarm des Insektenwirtes infektiös, während die BVs für die Verbreitung der Infektion über die Gewebe der Insekten und in Zellkultur verantwortlich sind. Die Möglichkeit, BVs über Plaques in Zellkultur zu reinigen, führte zur Isolierung von Mutanten und der Fähigkeit, klonale virale Isolate sicher zu charakterisieren. Durch seine sehr einfache Vermehrung in der Zellkultur, seiner Stabilität und seiner relativ großen Infektionsbreite wurde in dieser Zeit der *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcMNPV) Focus des wissenschaftlichen Interesses. Mit der Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologie wurde es in den späten 70iger Jahren möglich, definierte Segmente der Baculovirus-DNA in *Escherichia coli* zu klonieren und individuell die Gene und ihre Funktion im Detail zu analysieren (Smith & Summers, 1978, Smith et al., 1983). Die Entdeckung, daß das Polyhedringen für *in vitro* Infektionen nicht essentiell ist und gegen ein gewünschtes Fremdgen ausgetauscht werden kann, führten zur Etablierung des Baculovirus-Expressionssystems. In den letzten zwei Dekaden hat sich die Baculovirologie zu einem bedeutenden, biotechnologisch relevanten Forschungszweig entwickelt. Die Nutzung der Baculoviren als Vektor für die Expression heterologer Gene führte zur extensiven Verbreitung in der biomedizinischen Forschung, und nicht zuletzt wird in jüngerer Zeit auch eine mögliche Nutzung der Baculoviren als Transfervektor für die Gentherapie diskutiert (Hoffmann et al., 1995, Boyce & Bucher, 1996).



## 1.2. Baculoviren

Die Arten der Baculoviren können über 500 verschiedene Arthropoden-Arten befallen (Granados & Hashimoto, 1989). Die Baculoviren sind durch eine doppelsträngige, zirkuläre DNA mit einer Größe von 88-200 kbp charakterisiert (Blissard, 1996). Sie ist mit einem stark basischen (Arginin-reichem) 6,5 kDa Protein assoziiert (Tweeten et al., 1980, Kelly et al., 1983, Wilson et al., 1987), das innerhalb eines stäbchenförmigen Nucleocapsides lokalisiert ist (Thiem & Miller, 1989). Die Größe des Virusgenoms bestimmt dabei die Länge der Nucleocapside, die zwischen 200-400 nm variieren kann, während der Durchmesser konstant bei ca. 36 nm liegt (Fraser, 1986). Die Nucleocapside sind von einer Lipoproteinhülle umschlossen und formen einen Viruspartikel oder ein Virion, das von einem *occlusion body*, der Polyhedra, eingeschlossen sein kann (Abb. 1). Der Polyhedra besteht in der Majorität aus einem einzigem Protein, dem Polyhedrin, das eine Größe von 30 kDa aufweist (Rohrmann, 1986). Die polyedrischen Einschlußkörper (Polyhedra), die eine äußere Polysaccharidhülle besitzen, entwickeln sich im Kern der infizierten Zellen. In ihrer Größe variieren sie zwischen 1-15 µm im Durchmesser.



**Abb. 1.** Schematischer, repräsentativer Schnitt durch die Polyhedra eines Baculovirus (Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus, MNPV).

Die Familie der Baculoviridae umfaßt nur eine Gattung, die Gattung Baculovirus, die sich in drei morphologisch stark unterschiedliche Gruppen einteilen läßt (Bilimoria, 1986):

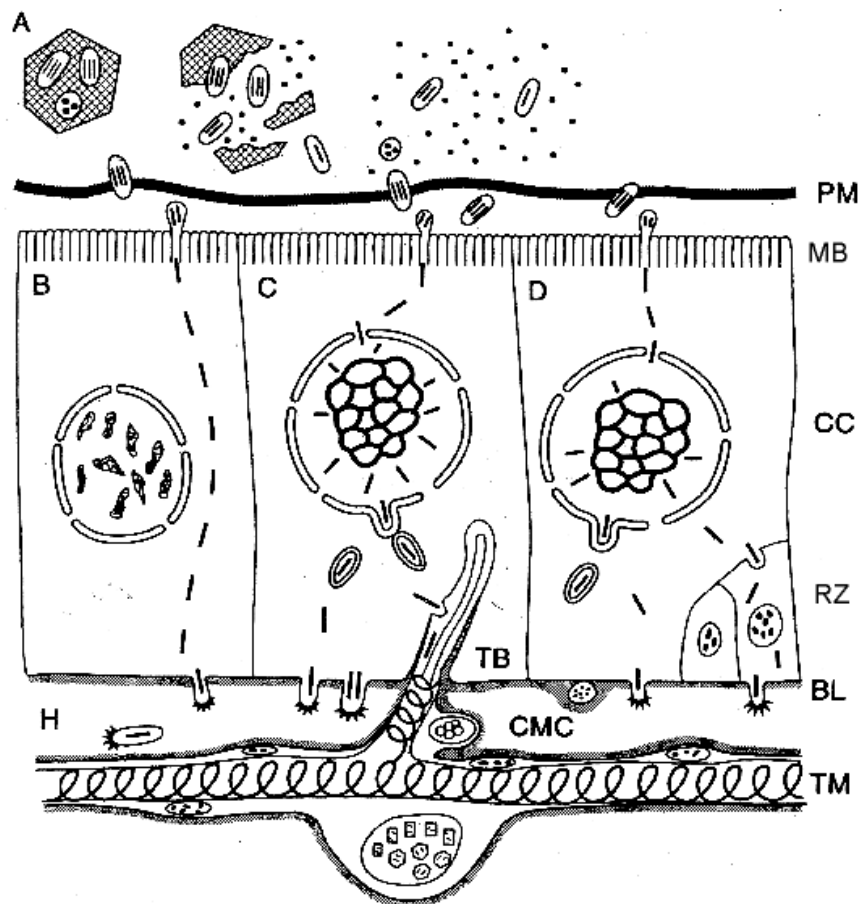
- S Gruppe A, die Nuclear Polyhedrosis Viren (NPV), bei denen mehrere Virionen vom Polyhedrin eingeschlossen sind. Nach der Anzahl der Nucleocapside, die in einem Virion lokalisiert sind, unterteilt man diese Gruppe weiter in Single (S) oder Multiple (M) MNPVs. Ein MNPV ist in Abb.1 dargestellt.
- S Gruppe B, oder Granulosis Viren (GV), die ein einziges Virion mit nur einem Nucleocapsid besitzen und von einem granulären Protein eingeschlossen sind.
- S Gruppe C, die *non-occluded* Viren (NOV), die keine *occlusion bodies* produzieren.

Benannt werden die Baculoviren gewöhnlich nach dem Wirt, aus dem sie isoliert wurden. Zum Beispiel wurde der am besten untersuchte und zur Expression rekombinanter Proteine genutzte Vertreter, der *Autographa californica* MNPV (AcMNPV), aus dem Schmetterling *Autographa californica* isoliert (Vail et al. 1971). Zu einem sehr effizienten Expressionsvektor entwickelten Maeda et al. 1985 daneben auch den *Bombyx mori* (Seidenraupe) (*Bm*) MNPV, der beispielsweise sehr nützlich zur Expression von Proteinen in Seidenspinner-Larven ist. Dieser Vektor hat aber trotz seiner einfachen Handhabung nicht annähernd so eine weite Anwendung gefunden wie das AcMNPV-Expressionssystem.

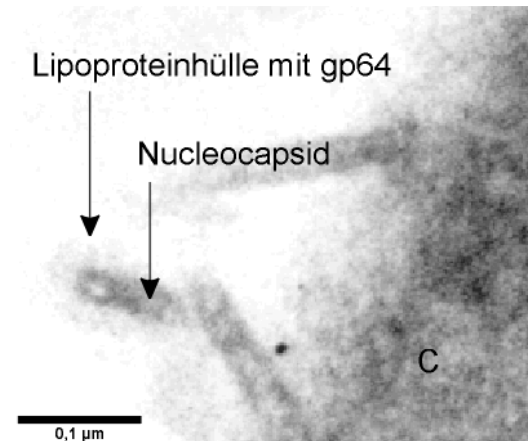
### 1.3. Pathologie und Baculovirus-Expressions-Konzept

Der Vermehrungszyklus der Baculoviren ist sehr komplex und in einer Vielzahl von Übersichtsartikeln beschrieben (Blissard und Rohrmann, 1990, Granados und Williams, 1986, Volkmann und Knudsen, 1986, Williams und Faulkner, 1996). *In vivo* beginnt der Infektionszyklus im Zuge der Nahrungsaufnahme mit der Ingestion und dem anschließenden Transport in das Mitteldarm-Epithel. Innerhalb weniger Sekunden

bis Minuten nach Ingestion lösen sich die *occlusion bodies* (Polyhedra) aufgrund des vorherrschenden alkalischen pH-Wertes (8-11) und unter Assistenz von Proteasen auf (Abb.2a) (Granados, 1978, Horton und Burand, 1993). Im Verlauf der Evolution hat dabei die Polyhedra zwei ganz entscheidende Funktionen entwickelt. Zum einen schützt sie die Viren außerhalb des Wirtes, so daß sie über Jahre infektiös bleiben (Überlebensmechanismus), zum anderen besitzt sie die Fähigkeit, durch eine schnelle Dissolution eine schnelle Invasion der Viren zu ermöglichen. Nach Überwindung der peritropen Membran, die den Darm umschließt, fusioniert die Lipoproteinhülle der



**Abb.2.** Schematische Darstellung einer Baculovirusinfektion in vivo. (a) Dissolution der Polyhedra in das Mitteldarmlumen und Transfer der Virionen durch die peritrope Membran (PM). (b-d) zeigen die möglichen unterschiedlichen Infektionswege. (b) Die Lipoproteinhülle fusioniert mit der microvillären Membran (MB) und die Nucleocapside gelangen direkt zur Basallamina (BL), durch die sie knospen und in die Hämolymphe (H) gelangen. (c) Der initiale Zyklus der Replikation erfolgt im Mitteldarm-Epithel-Zellkern, nach der die Progenitor-Viren direkt in die Hämolymphe (H) oder in die tracheale Matrix (TM) via Tracheoblasten (TB) gelangen. (d) Nach der initialen Replikation werden sich regenerierende Mitteldarmzellen (RZ) infiziert. (nach Frederici, 1997).

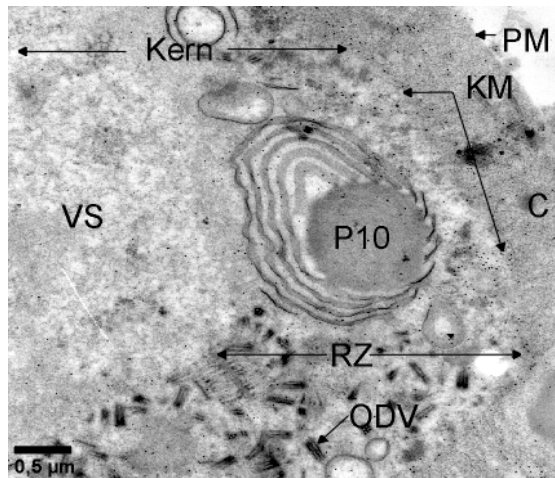


**Abb3.** Elektronenmikroskopische Aufnahme von BVs. Die BVs knospen durch die Plasmamembran und erhalten so die neue Lipidhülle mit dem viralen gp64.

Virionen mit den mikrovillären Membranen der Mitteldarmepithelzellen (Abb.2c). Anschließend bewegen sich die Nucleocapside wahrscheinlich mit Unterstützung der Mikrotubuli zu den Kernporen und in den Kern hinein, wo sie die Capsid-Hülle ablegen und die Virus-DNA freisetzen (Charlton und Volkmann, 1993, Granados und Lawler, 1981). In der Folge

hypertrophiert der Kern, die Nucleoli vergrößern und bewegen sich Richtung Kernmembran, um

sich bei beginnender Ausbildung des virogenen Stromas (Ort der Virusreplikation) wieder zu verringern. Während dieser Zeit haben die Viren den Biosyntheseapparat der Zelle okkupiert, und es werden neue Nucleocapside synthetisiert, die dann an der Peripherie des virogenen Stromas assemblieren und in die dort die neu synthetisierte Baculovirus-DNA verpackt wird. 12 Stunden nach der Infektion verlassen die Nucleocapside das Stroma und knospen durch die Kernmembran, wodurch sie eine Lipidhülle erhalten. Diese Hülle legen sie im Cytoplasma wieder ab, bevor sie sich eine neue bei der zweiten Knospung durch die Plasmamembran zulegen (Abb. 2c, 3). Diese dann als *Budded Viruses* (BVs) bezeichneten Viren tragen dann durch diesen Vorgang auf ihrer Oberfläche viruscodierte Proteine wie das gp64, welche essentiell für die Verbreitung der Infektion in andere Gewebe sind (Blissard und Rohrmann, 1990, Blissard und Wenz, 1992, Granados und Lawler, 1981, Monsma et al., 1996). Die BVs gelangen dann entweder direkt in die Hämolymphe oder akkumulieren zwischen der Basallamina und den Mitteldarmzellen, um später in die Hämolymphe überzutreten (Abb. 2d). Die Hämolymphe verteilt die BVs über den gesamten Körper und erleichtert so die schnelle Transmission der Viren (Granados und Williams, 1986). Des weiteren konnten Engelhard et al. 1994 zeigen, daß BVs auch über die Tracheolen entweder direkt in die Hämolymphe und von dort in andere Gewebe bzw. wahrscheinlicher zu anderen Geweben lateral über die tracheale Matrix durch das tracheenspezifische



**Abb.4.** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Baculovirus-infizierten High Five Zellen in der Polyhedra-Phase. Während dieser Phase werden ODVs produziert, die in der Ringzone im Kern akkumulieren. Da es sich um ein rekombinantes Virus handelt werden keine occlusion bodies gebildet (s.u.). RZ, Ringzone; VS, virogenes Stroma; KM, Kernmembran; P10, fibrilläre Körper mit p10-Protein; C, Cytoplasma; PM, Plasmamembran

Lymphsystem gelangen. Neben dem oben beschriebenen Infektionsweg können auch einige Nucleocapside den Kern umgehen, sich an die Plasmamembran anheften und nach erfolgter *very early-gp64*-Expression durch die Plasmamembran knospen und direkt in die Hämolymphe gelangen (Jarvis und Garcia, 1994, Blissard und Rohrmann, 1989, 1990) (Abb. 2a). Eine dritte Invasion der Viren ist bei Flipsen et al. 1993 näher beschrieben, die über die sich regenerierenden Darmzellen verläuft (Abb.2d).

Abhängig von der Art der infizierten Insektenzellen erreicht die BV-Produktion

nach 12-16 Stunden ein Maximum. Danach wird die virale Replikation auf die ODV-Phase umgeschaltet, in der die ODVs und das Polyhedrin gebildet werden (Granados und Williams, 1986, Volkmann und Knudsen, 1986). Die ODVs akkumulieren in der Ringzone zwischen virogenem Stroma und Kernmembran (Abb.4), von der sie durch den Bruch der Kernmembran in das Cytoplasma und letztendlich nach der Lyse der Zellen 4-5 Tage nach Infektion freigesetzt werden.

Für die *in vitro* Infektion ist der Überlebensmechanismus, wie er in der Natur *per se* besteht, nicht erforderlich. So führte die Entdeckung, daß das für Polyhedrin codierende Gen nicht essentiell ist (Carstens et al., 1980), zur Entwicklung des Baculovirus-Expressions-Konzeptes. Da das Polyhedrin-Gen unter einem *very late* Promotor exprimiert wird und der Polyhedrinanteil bis zu 50 % des gesamten zellulären Proteins ausmachen kann (Luckow und Summers, 1988), können so nach Austausch gegen ein Fremdgen rekombinante Proteine bis zu einer Konzentration von  $500 \text{ mg ml}^{-1}$  im Überstand von *in vitro* Kulturen (Chico und Jäger, 2000) produziert werden. Neben dem Polyhedrinpromotor konnten für die Expression rekombinanter Proteine auch eine ganze Reihe von Plasmidvektoren mit verschiedenen Promotoren wie

der *late*-p6,5 (Hill-Perkins und Possee, 1990) oder der *very late*-p10 (Vlak et al., 1990) etabliert werden.

Für bestimmte Fragestellungen wie Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen, Assembling von funktionalen Proteinkomplexen oder biochemischen Stoffwechselwegen ist es oft nötig, mehr als ein Gen gleichzeitig zu exprimieren. Speziell für diese Problematik ist das Baculovirus-Expressionssystem besonders gut geeignet. Erste Schritte dazu wurden von St. Angelo et al. (1987) publiziert, die Koinfektionen mit zwei und mehr verschiedenen Baculoviren durchführten. Emery und Bishop (1987) konnten zwei verschiedene Gene in einer Zelle synthetisieren, indem sie einen dualen Vektor mit zwei Kopien des Polyhedrin-Promotors generierten. Im weiteren Verlauf der Entwicklung wurden Transfer-Plasmide entwickelt, die verschiedene Kombinationen unterschiedlicher viraler Promotoren wie Polyhedrin, p10 und vp39 tragen (Belyaev et al., 1995, Wang et al., 1991). Damit können nun Baculoviren generiert werden, mit denen man bis zu fünf verschiedene Proteine in einer Zelle produzieren kann.

#### **1.4. Insektenzellen als Wirt für die Expression rekombinanter Proteine**

Die meisten heterologen Expressionen wurden und werden, ausgenommen einiger Arbeiten mit *Drosophila melanogaster* Zellen (S2- oder Kc-Zellen) und Mosquito-Zellen, in *Lepidopteren* durchgeführt (Bernard et al., 1994, McCarrol und King, 1997). Am häufigsten werden IPLB-Sf21AE Zelllinien des *fall army worms* *Spodoptera frugiperda* (amerikanischer Heerwurm) und ihr klonales Derivat Sf9, benutzt. So entwickelte sich der Name „Insektenzellen“ auch als eine Art Synonym für Sf9- und Sf21-Zellen. Nichts desto trotz sind in den letzten Jahren eine ganze Reihe anderer Zelllinien etabliert worden (z.B. Hink et al., 1991). Unter diesen Zelllinien sind besonders die aus *Trichoplusia ni* (Tn-368 und BTI-Tn-5B1-4), aus *Bombyx mory* (Bm-N), *Mamestra brassicae* (Mm0503) und aus *Estigmene acrea* (EaA) hervorzuheben. Dabei ist die letztgenannte hauptsächlich aufgrund ihres Glycosylierungspotentials, mit der Kapazität zur Ausbildung von N-Glycanen mit terminalen N-Acetylglucosaminen, erwähnenswert (Ackermann, 1995, Grabenhorst, 1999, Ogonah et al., 1996). Eine

alternative Strategie der Insekten-zellkultur stellt die Infektion der gesamten Larve mit einem rekombinanten Baculovirus dar (Reis et al., 1992, Maeda et al., 1985, Korth und Levings, 1993). Hier existieren aber in bezug auf die Charakterisierung rekombinanter Proteine kaum Daten. Lediglich die N-Glycane rekombinanter sekretorischer Alkalischer Phosphatase aus verschiedenen Larven sind näher untersucht worden (Kulakosky et al., 1998).

### **1.5. Herstellung rekombinanter Proteine mit dem Baculovirus Expressionssystem**

Die Biosynthese vieler eukaryotischer Proteine schließt ko- und posttranslationale Modifikationen ein, die sich sehr kritisch auf die Eigenschaften wie die Löslichkeit, Funktion etc. der Proteine auswirken können. Das Baculovirus-Expressionssystem besitzt die Fähigkeit, die meisten proteinprozessierenden Stoffwechselwege, die mit höheren Eukaryoten assoziiert werden, korrekt auszuführen (Luckow und Summers, 1988, Miller, 1988). So waren die meisten der bisher in Insektenzellen exprimierten Proteine biologisch aktiv und glichen ihren natürlichen Gegenstücken weitgehend hinsichtlich Oligomerisation, Disulfidbindung, Proteolyse, Phosphorylierung und einigen anderen kovalenten Modifikationen. Insektenzellen sind in der Lage heterologe Protein-Targeting-Signale korrekt zu erkennen und Proteine zu den entsprechenden zellulären Kompartimenten zu dirigieren bzw. zu sekretieren. So konnten Kuroda et al. (1989) in Mitteldarm-Epithelzellen von Insekten polarisierte Zelloberflächenexpression rekombinanter Proteine nachweisen. In infizierten Zellen werden mitochondriale Proteine zu den Mitochondrien (Takagi et al., 1992) und nucleäre Proteine zum Kern transferiert. Dabei konnte bei zwei Baculovirus-codierenden Kernproteinen nucleäre Targeting-Signale nachgewiesen werden, die höheren eukaryotischen Signalen entsprechen (Broussard et al., 1996). Bei lysosomalen Enzymen, die in infizierten Insektenzellen produziert werden, erfolgt durch das Fehlen des Mannose-6-phosphat-Signals kein Targeting zu den Lysosomen, sondern vielmehr ihre Sekretion (Boose et al., 1990). Insektenzellen fehlt wahrscheinlich die Phosphotransferase, die für diese

Modifikation verantwortlich ist (Aeed und Elhammer 1994).

Ein Hauptgrund für die Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems ist die Tatsache, daß signifikante Produktmengen des gewünschten Produkts bereits wenige Wochen nach der Generierung der Viren produziert werden können, während Säugerzellen zumeist in zeitaufwendigen Amplifikationsverfahren zur Bildung akzeptabler Produkttiter selektioniert werden müssen. So können mit diesem Expressionssystem Produktausbeuten von 100 - 800 mg l<sup>-1</sup> erreicht werden, die 20 bis 250-fach höher sind im Vergleich zu Säugerzellexpressionen (Shuler et al., 1995).

Die Produktausbeuten von konstitutiv sekretorischen rekombinanten Glycoproteinen sind dagegen auch in dem Baculovirus-Expressionssystem sehr häufig deutlich vermindert und liegen oft nur zwischen 1 - 10 mg l<sup>-1</sup> (Shuler, 1995). Untersuchungen dieses Phänomens verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, daß diese verminderten Produktausbeuten mit der intrazellulären Akkumulation von großen Anteilen des jeweiligen rekombinanten sekretorischen Proteins zusammenhängen. Es handelt sich dabei um unlösliche Ablagerungen, die vergleichbar mit *inclusion bodies* in *E. coli* sind und deren Anteil zwischen 50 % und 90 % des synthetisierten rekombinanten Proteins betragen kann. So wurde gezeigt, daß die konstitutive Sekretion von funktional aktiven IgG in Baculovirus-infizierten Insektenzellen mit falsch assoziierten Ketten und Aggregaten begleitet war (Hasemann und Capra, 1990, Hsu et al., 1994). In anderen Berichten wie beispielsweise bei der Expression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des humanen Choriongonadotropins (hcg) (Nakhai et al., 1991), des Major-Histokompatibilitäts-Komplexes (MHC)-Antigens (Stern und Wiley, 1992), des t-PA (Jarvis und Summers, 1989) des Pre-Proattacin (Gunne et al., 1990) des Insulin-Rezeptors (Sissom und Ellis, 1989) und des IL2 (Grabenhorst, 1994) ist das Phänomen der Produktakkumulation ebenfalls beschrieben. Wie die angegebenen Beispiele zeigen, ist das Akkumulationsphänomen bei der Expression von ganz verschiedenen Proteinen mit unterschiedlichen Expressionsraten beschrieben. Es scheint sich damit um ein generelles Phänomen zu handeln, das weitgehend unabhängig von der Transkriptions- und Translationsrate ist. Die Ursachen für dieses Phänomen sind jedoch nicht bekannt. In diesem Zusammenhang werden aber für die



Akkumulation von rekombinanten Proteinen Engpässe des sekretorischen Stoffwechselweges wie eine falsche Proteinfaltung der neu gebildeten Proteinketten postuliert, die versucht wurde und wird, durch Koexpression des rekombinanten Proteins mit Chaperonen wie BiP (*heavy chain binding protein*) (Hsu et al., 1994, Veijola et al., 1996) oder PDI (Proteindisulfidisomerase) (Hsu et al., 1996) oder anderen prozessierenden Enzymen des sekretorischen Stoffwechselweges zu minimieren. Alternativ wurde auch schon eine stabil transfizierte Insektenzelllinie generiert, die die Peptidyl-cis/trans-Isomerase exprimiert (Lennard und Reiländer, 1997). Diese Arbeiten konnten zumeist den intrazellulär löslichen Anteil des jeweiligen Modellproteins erhöhen. In keiner Arbeit wurde jedoch das Problem der Produktakkumulation rekombinanter Proteine mit diesen *metabolic engineering* Ansätzen gelöst.

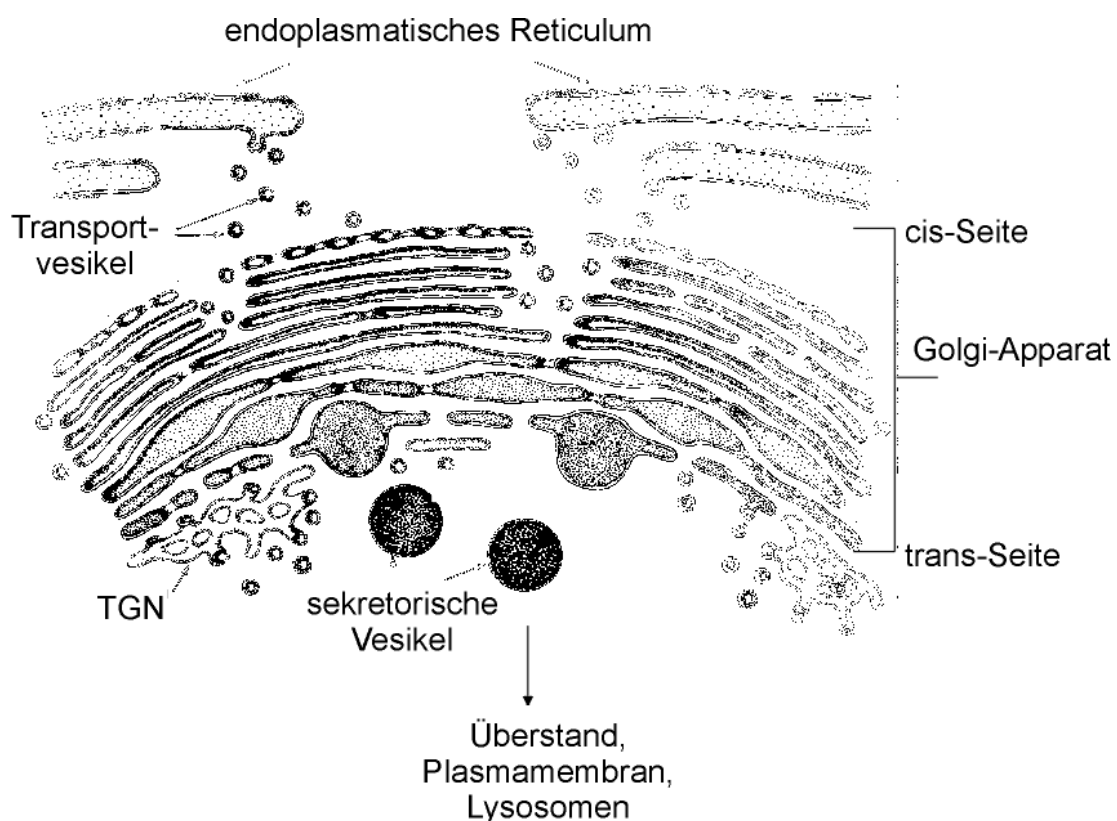
Um die Ursachen für diese intrazelluläre Akkumulation der rekombinanten sekretorischen Glycoproteine zu verstehen, ist eine fundierte Kenntnis der Biosynthese von konstitutiv sekretorischen Proteinen in Insektenzellen essentiell.

### **1.6. Biosynthese von sekretorischen Proteinen**

Aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit soll im folgenden der allgemeine Verlauf der Biosynthese von sekretorischen Proteinen kurz skizziert werden, der in einigen Reviews beispielsweise bei Palade (1975), Lodish (1988), Rothmann (1994) und Warren und Mellmann (1999) detailliert beschrieben ist. Der sekretorische Stoffwechselweg eukaryotischer Zellen umfaßt einen Satz distinkter interner Membransysteme, die Organellen bzw. Kompartimente, die die neu synthetisierten Proteine vektorieell bis zu ihrer Sekretion in den extrazellulären Raum durchlaufen. Dazu gehören das endoplasmatische Reticulum (ER), der cis-, medial- und trans Golgi-Apparat, das trans Golgi Netzwerkes (TGN), die Intermediat-Kompartimente und die Vesikel. Jede dieser Organellen hat dabei seinen eigenen Pool an residenten Membranproteinen, der die Struktur und Funktionen der Organellen definiert, so daß die Proteine spezifisch in den einzelnen Kompartimenten durch eine Serie von ko- und

posttranslationalen Prozessen wie z.B. der Signalpeptidabspaltung, Herstellung der korrekten Proteinfaltung, der Proteinglycosylierung etc. modifiziert werden. Während dabei die prozessierenden Enzyme des ER homogen über die Organelle verteilt sein können oder aber auch in Subregionen segregieren, sind die prozessierenden Enzyme des Golgi-Apparates gradientenartig in den verschiedenen diskontinuierlichen, cisternenartigen Membranen (cis, medial, trans) lokalisiert. Der Transport von Proteinen von einem Kompartiment zum anderen erfolgt vesikulär durch Transportvesikel. Sie entstehen durch Membranabschnürung des Donorkompartiments und werden so mit einer Molekülfracht beladen. Die Entladung der Fracht in das Akzeptorkompartiment erfolgt durch Fusion mit dessen Membran.

Der allgemeine Verlauf der Biosynthese sekretorischer Proteine ist in Abb.5 dargestellt.



**Abb.5.** Allgemeiner Verlauf der Biosynthese sekretorischer Proteine. Der Sekretionsweg umfaßt den vektoriellen Transport von Proteinen in Transportvesikeln vom ER über den Golgi-Apparat in das trans Golgi Netzwerk (TGN). In diesem Kompartiment werden die Proteine sortiert und dann je nach Bestimmung in den extrazellulären Raum oder in die Lysosomen transportiert oder in die Plasmamembran inseriert (nach Bloom und Fawcett., 1994)

Die Prozessierung der naszierenden sekretorischen Polypeptide als auch der luminalen und membrangebundenen Polypeptide des ERs, des Golgi-Apparates, der Lysosomen und der Plasmamembran beginnt mit deren Translation und der Insertion in das Lumen des ER. Hier erfolgen cotranslational die Signalpeptidabspaltung und die ersten Schritte der N-Glycosylierung und der Proteinfaltung durch Knüpfung von Disulfidbindungen. Nach Abschluß der Translation erfolgen im weiteren Verlauf die Ausbildung der korrekten Proteinfaltung und die Bildung von Oligomeren aus entsprechenden Untereinheiten. Die korrekte Proteinfaltung der synthetisierten Proteine ist dabei eine Vorbedingung für den Transport in den Golgi-Apparat, wo weitere prozessierende Schritte stattfinden. Anschließend werden die Proteine in das TGN dirigiert, wo sie in sekretorische Vesikel sortiert und dann in den extrazellulären Raum gelangen. Der Verlauf der Biosynthese kann auf molekularer Ebene durch die Analyse der durchgeführten ko- und posttranslational ausgeführten Modifikationen verfolgt werden. Aus diesem Grund wird nachfolgend detaillierter die Signalpeptidabspaltung, die Bildung von Disulfidbrücken und die Proteinglycosylierung an sich und in Insektenzellen diskutiert.

### **1.6.1. Signalpeptidabspaltung**

Die meisten sekretorischen Proteine enthalten N-terminal eine kurze Peptidsequenz, das Signalpeptid. Die Funktion des Signalpeptides im Sekretionsprozeß besteht in dem Targeting von neu synthetisierten naszierenden Polypeptiden zu der Translokationsmaschinerie der ER-Membran.

Erste Arbeiten auf diesem Gebiet wurden von Milstein et al. (1972) durchgeführt. Sie konnten zeigen, daß die leichten Ketten eines IgG, die in einem zellfreien System synthetisiert wurden, größer waren als die reifen sekretorischen Ketten. Die größeren Polypeptidketten besaßen N-terminal zusätzlich einige hydrophobe Aminosäuren, die Signalpeptide, die entfernt wurden, wenn während der Proteinsynthese zu dem zellfreien System ER-Membranen gegeben wurden. Im weiteren Verlauf der Forschung entwickelten Blobel und Dobberstein (1975) die Signalthypothese. Sie postulierten, daß

ein ER-spezifischer Signalsequenzrezeptor an die Signalpeptide der naszierenden Polypeptide bindet, um die initiale Penetration in die ER-Membran zu erleichtern. Weiter postulierten sie einen Proteinkanal in der ER-Membran, durch den die hydrophilen Polypeptide durch die hydrophobe ER-Membran transferiert werden. Die Gültigkeit dieser Postulate konnte inzwischen durch die Arbeiten von Wickner et al. (1991), Rapoport (1992) und Sanders und Schekmann (1992) bewiesen werden.

Nach der Insertion in die ER-Membran wird das Signalpeptid der naszierenden Polypeptidkette im Lumen des ER durch eine Signalpeptidase kotranslational abgespalten (Evans et al., 1986). Ohne diese Abspaltung oder durch eine ineffiziente Signalpeptidabspaltung werden die Polypeptide dem sekretorischen Stoffwechselweg und den sequentiellen Prozessierungen entzogen und aggregieren oder bleiben membrangebunden (Dalbey und Wickner, 1985, Boni et al., 1988).

Signalpeptide sind Sequenzen von Aminosäuren, die N-terminal an sekretorischen Polypeptiden lokalisiert sind. Bei diesen Signalsequenzen handelt es sich nicht um Consensussequenzen, sondern vielmehr um Sequenzen, die sich in ihren physikochemischen Eigenschaften sehr ähnlich sind (von Heijne, 1985, Gierasch, 1989, Jain et al., 1994). Gewöhnlich sind sie zwischen 15 und 30 Aminosäuren lang und bestehen aus drei unterschiedlichen Regionen, einer kurzen positiv geladenen N-terminalen Region, einer mittleren aus 10 bis 20 hydrophoben Aminosäuren bestehenden Region und der carboxyterminalen Region mit der Schnittstelle. Die Erkennung der Schnittstelle durch die Signalpeptidase erfolgt über die relativen Positionen der hydrophoben und geladenen Domänen und der Sekundärstruktur der Signalpeptide. Durch Analyse der Schnittstellen vieler Signalpeptide konnte von Heijne (1983) die -1, -3 - Regel aufstellen, mit der es möglich ist, potentielle Schnittstellen der Signalpeptidase vorauszusagen. Nach dieser Regel befinden sich an -1 kleine ungeladene Aminosäuren (A, G, S) und an -3 ebenfalls diese kleinen ungeladenen Aminosäuren oder hydrophoben Aminosäuren (F, I, L, M, V). Der Autor vermutet, daß die Aminosäuren der Positionen -1 und -3 in die Tasche der Signalpeptidase binden und dadurch eine effiziente Spaltung ermöglichen. Durch Veränderungen der Aminosäuren an diesen Positionen durch Mutagenese wird die Signalpeptidabspaltung

dann auch unterbunden. Neben diesem Hauptkriterium gibt es weitere Kriterien, die für die korrekte Signalpeptidabspaltung wichtig sind. So treten an -2 kaum kleine ungeladene Aminosäuren auf. Dort werden große aromatische Aminosäuren (F, H, W, Y) bevorzugt. Die Sekundärstruktur-brechenden Aminosäuren G und P sind in der Position -4 und -5 vorherrschend. Desweiteren gibt es kein einzelnes P in der Region -3 bis +1. Hydrophobe Reste scheinen in den Positionen +1 und -2 bis -4 nur toleriert zu sein und sind in der Position -5 sehr selten. Ab -6 werden sie hingegen dominant, was sich bis zum zentralen hydrophoben *core* des Signalpeptids fortsetzt. Geladene Reste werden in den Positionen -2, -4 und -5 toleriert, sind aber hauptsächlich an +1, also am Startpunkt der reifen Sequenz, vertreten. Insektenzellen besitzen die Fähigkeit, die meisten Signalpeptide zu erkennen und im ER abzuspalten. Durch N-terminale Sequenzanalyse von rekombinanten Proteinen aus dem extrazellulären Raum konnte die korrekte Signalpeptidabspaltung beispielsweise für das humane  $\alpha$ -Interferon (Maeda et al., 1985) und das humane Interleukin 2 (Smith et al., 1985) nachgewiesen werden. Sehr wenig ist hingegen über die Effizienz der Signalpeptidabspaltung gerade auch im Hinblick auf die durch die Baculovirusinfektion einsetzende Kompromittierung des sekretorischen Stoffwechselweges bekannt. Lediglich in einer detaillierten Untersuchung konnten Lebacqz-Verheyden et al. (1988) zeigen, daß in Baculovirus-infizierten Insektenzellen auch ungewöhnliche Spaltprodukte entstehen können, die in Mammaliazellen nicht gebildet werden. Sie exprimierten den humanen *gastrin-releasing* Peptid Precursor (GRP1-125) und wiesen nach, daß der Precursor korrekt in das aktive Peptid GRP1-27 und in einen C-terminalen Teil GRP31-125 gespalten wurde. Daneben wurden aber noch eine ganze Reihe weiterer neuer Spaltprodukte identifiziert, die nach Expression des rekombinanten Proteins in den Lungenkrebszelllinien NCI-H345 und NCI-N417 nicht gebildet wurden.

### 1.6.2. Bildung von Disulfidbrücken

Der Geschwindigkeits-bestimmende Schritt der konstitutiven Sekretion besteht darin, wie schnell die neu synthetisierten Proteine das ER verlassen. Die Zeit, die für den Export aus dem ER benötigt wird, ist dabei determiniert durch die Rate der Proteinfaltung und die Bildung von Oligomeren. Falsch gefaltete, aggregierte, und nicht korrekt assemblierte Oligomere werden im ER zurückgehalten und abgebaut (Gething et al., 1986).

Die Bildung von Disulfidbindungen zwischen zwei Cysteinresten zählt zu den wichtigsten Strukturelementen, mit deren Hilfe die Tertiärstruktur von Proteinen stabilisiert wird (Freedmann et al., 1984). Disulfidbindungen entstehen ko- und posttranslational durch Oxidation von Thiolaten zweier Cysteine (Bergmann und Kuehl, 1979). Durch *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, daß die Bildung einer Disulfidbrücke von der Konformation und dem Redoxpotential der Umgebung abhängig ist (Creighton, 1984). Disulfide besitzen keine inhärente Stabilität. Vielmehr öffnen sich die Bindungen und bilden neue Brücken aus, bis unter den jeweiligen Bedingungen eine thermodynamisch stabile Disulfidbindung eingenommen wird (Roth und Pierce, 1987). Es wird vermutet, daß dieser Prozeß durch Chaperone wie die Proteindisulfid-isomerase unterstützt wird (Bullied und Freedmann, 1988).

Insektenzellen sind in der Lage sowohl über Disulfidbidungen Tertiärstrukturen zu stabilisieren als auch komplexere höhergeordnete Strukturen über Disulfide auszubilden (Giese et al., 1989). Auch hier ist aber ähnlich wie bei der Signalpeptidabspaltung sehr wenig über die Effizienz der Ausbildung von Disulfidbrücken bekannt.

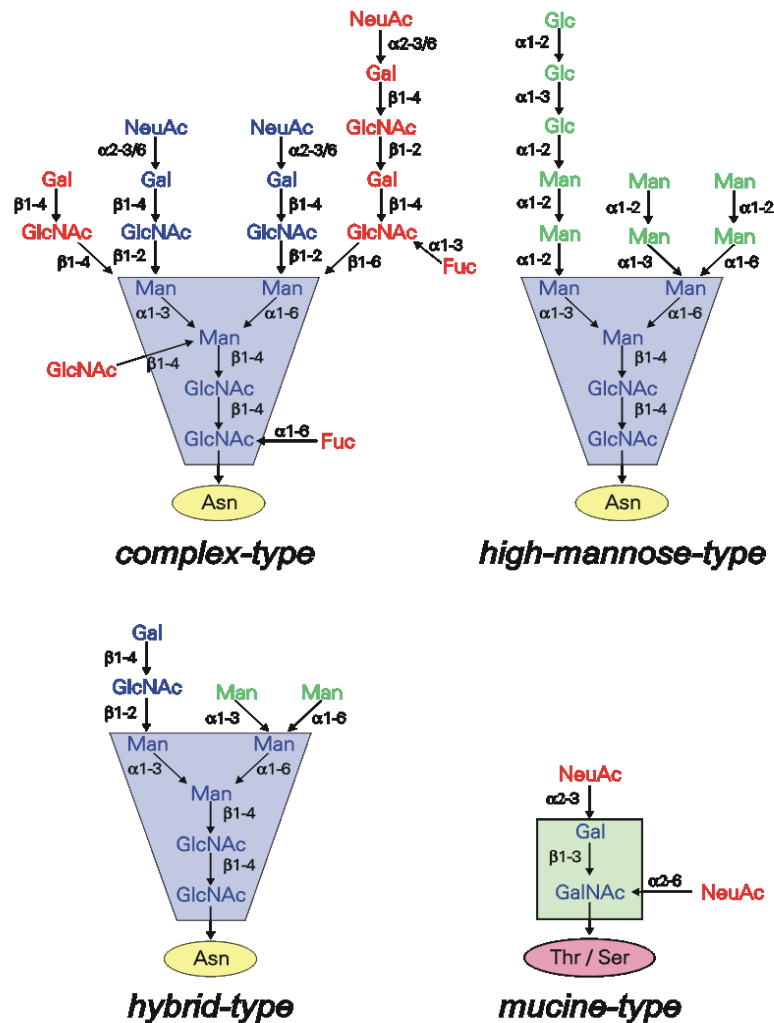
### 1.6.3. Proteinglycosylierung

Die Proteinglycosylierung ist eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen in eukaryotischen Organismen. So wird die Funktion der Proteinglycosylierung heute in Zusammenhang gebracht mit so unterschiedlichen Eigenschaften wie einer verbesserten Löslichkeit, dem Schutz vor Proteasen, der Schaffung und der Maskierung von Epitopen, der Zell-Zell-Erkennung, der

Stabilisierung der Konformation von Proteinen, der Regulation der Funktion von Serumproteinen etc. (Jenkins und Curling, 1994).

Die Bildung von Glycanen durch kovalente Knüpfung erfolgt entweder O-glycosidisch an Hydroxyaminosäuren (Serin, Threonin, 4-Hydroxyprolin, 5-Hydroxyprolin) oder N-glycosidisch am Amid-Stickstoff eines Asparaginrestes. Für beide Modifikationen werden die gleichen Nucleotidphosphat- bzw. Monophosphat-aktivierten Kohlenhydrate verwendet (UDP-N-Acetylglucosamin, UDP-N-Acetylgalactosamin, UDP-Galactose, GDP-Mannose oder CMP-N-Acetylneuraminsäure), die von speziellen Transportproteinen an den Locus der Synthese gebracht werden und nach Spaltung einer energiereichen Bindung sequentiell unter Einwirkung spezifischer Glycosyltransferasen miteinander verknüpft werden.

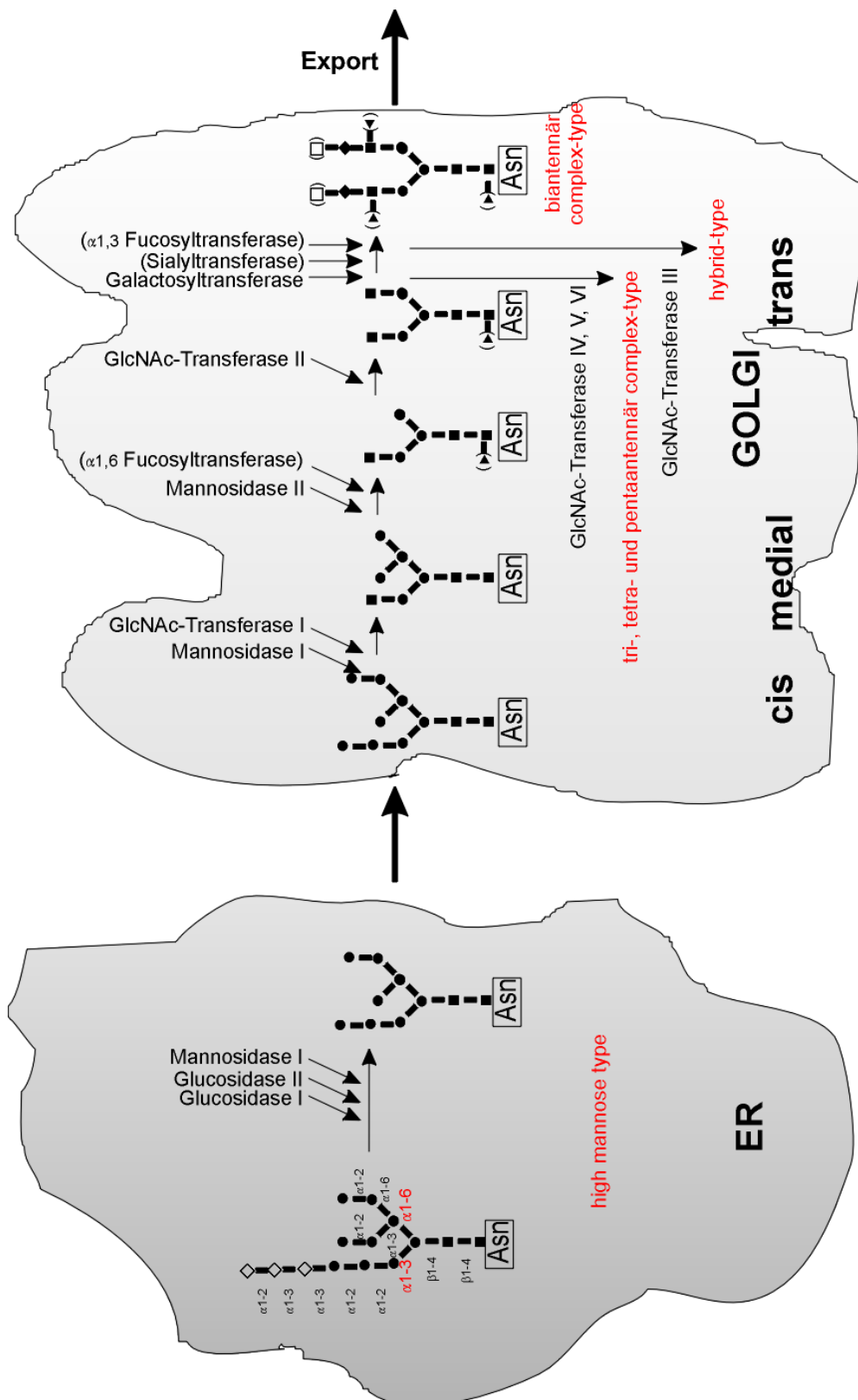
Eine effiziente N-Glycosylierung eines Proteins ist abhängig von einem ausreichenden Vorrat an lipidgebundenem Oligosacchariddonor, einer ausreichenden Aktivität der Oligosaccharyltransferase und einer zugänglichen Asn-Xaa-Thr/Ser Sequenz im Akzeptor (Protein). Das  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Oligosaccharidmolekül, entstanden durch kotranslationalen *en bloc* Transfer des an Dolicholphosphat gebundenen Oligosaccharidvorläufers  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  auf den Amid-N eines Akzeptors, wird im Verlauf des sekretorischen Pfades sowohl durch sukzessiven Abbau (*trimming*) als auch durch erneute Verknüpfung von Monosacchariden (*processing*) verändert. Die aus diesem Prozeß entstehenden Oligosaccharide lassen sich in drei Gruppen einteilen: in *high-mannose*, *hybrid-type* und *complex-type* N-Glycane (Abb.6). Sie besitzen alle die Grundstruktur  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , den *common core*. Darüberhinaus findet man bei *high-mannose-type*-Strukturen ausschließlich und bei *complex-type*-Strukturen keine Mannosen. *Hybrid-type* Glycane stellen eine Mischform dar. Im Gegensatz zu diesen Strukturen sind die O-Glycane meist sehr viel kleiner und weniger verzweigt als die N-Glycane, da das *processing* (s.u.) der O-Glycane gewöhnlich nicht so stark ausgeprägt ist wie bei N-Glycanen. Viele O-glycosylierte Serumproteine besitzen die *core* Struktur  $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ , die spezifisch mit NeuAc in  $\alpha 2,3$ -Bindung an Gal und in  $\alpha 2,6$ -Bindung an GalNAc modifiziert ist (*mucin-type*). Die O-Glycosylierung ist ausführlich bei



**Abb.6.** Hauptstrukturen der N-Glycane aus Säugerzellen. Alle N-glycosidisch gebundenen Oligosaccharide besitzen das common core Pentasaccharid  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (blau unterlegt), während bei O-Glycanen das Disaccharid Gal-GalNAc die core-Struktur darstellt. Im Zuge des processing zu complex-type N-Glycanen werden die in grün markierten Kohlenhydrate entfernt. Blau gekennzeichnete Kohlenhydrate kennzeichnen die typische biantennäre complex-type Grundstruktur, die noch modifiziert sein kann (rote Monosaccharide), (nach Grabenhorst, 1994).

Vliegthart et al. (1991) beschrieben. Im folgendem werden die einzelnen Schritte der N-Glycosylierung skizziert, die in einigen Reviews beispielsweise bei Kornfeld und Kornfeld (1985) und Snider (1984) detailliert beschrieben sind. Wie zuvor erwähnt beginnt die Proteinglycosylierung mit dem kotranslationalen *en bloc*-Transfer des an Dolicholphosphat gebundenen Oligosaccharid-Vorläufers  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  (vergl. Abb.6) im endoplasmatischen Reticulum (ER) während der Translokation der naszierenden Polypeptidkette auf den Amidstickstoff eines Asparagins (Abb.7). Diese





**Abb.7.** Exemplarische schematische Darstellung der Biosynthese N-glycosidisch gebundener Oligosaccharide.  $\uparrow$  N-Acetylglucosamin (GlcNAc), „ Mannose (Man), < Fucose (Fuc), ' Galactose (Gal), - NeuAc (Sialinsäure), " , Glucose

*high-mannose* Seitenkette wird durch die Glucosidasen I und II deglycosyliert und kann bereits das Endprodukt darstellen. Im weiteren Verlauf können diese Strukturen aber auch weiteren *trimming* und *processing* Schritten unterliegen, in denen sie entsprechend ihrer Destination zu *complex-type* oder *hybrid-type* Strukturen konvertiert werden (vergl. Abb.6). Das erfordert ER- und Golgi-ständige  $\alpha$ -Mannosidasen I, die alle  $\alpha$ -1,2 gebundenen Mannosen zu der Struktur  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  demannosylieren. An diese Struktur wird dann im medialen Golgi durch die GlcNAc-Transferase I ein N-Acetylglucosamin (GlcNAc) transferiert. Dieses Molekül ist ein Akzeptor für die nun angreifende  $\alpha$ -Mannosidase II, die von dem  $\alpha$ -1,6-Zweig zwei Mannosen entfernt. Die daraus entstehende  $\text{GlcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ -Kette ist das Schlüssel-Intermediat für die Entstehung von *complex-type* Strukturen (Abb. 7). Durch die Beteiligung der GlcNAc-Transferasen II, IV, V und VI können bi-, tri-, tetra- und pentaantennäre Strukturen entstehen, an die im trans-Golgi über verschiedene Glycosyltransferasen Galactosen (Gal), Glucosen (Glc) und Sialinsäuren (NeuAc) angefügt werden. *Hybrid-type* Strukturen entstehen hingegen, wenn an  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  vor der Demannosylierung durch die  $\alpha$ -Mannosidase II durch die GlcNAc-Transferase III ein GlcNAc auf die innere Mannose übertragen wird (Abb.6). Dieses Intermediat ist dann kein Akzeptor mehr für die  $\alpha$ -Mannosidase II, mit dem Ergebnis, daß letztendlich nur der  $\alpha$ -1,3-Zweig entsprechend mit Galactose (Gal), Glucose (Glc) und/oder Sialinsäure (NeuAc) verlängert wird. Häufig wird bei rekombinanten Proteinen auch eine proximale  $\alpha$ -1,6-Fucosylierung beobachtet.

Insektenzellen haben im Gegensatz zu dem hier skizzierten Mechanismus einen sehr eingeschränkten Glycoprotein-Biosyntheseapparat (Jarvis und Finn, 1995, Velardo et al., 1993). Rekombinante Glycoproteine, die nach Expression in rekombinanten Säugerzellen wie BHK (*baby hamster kidney*) *complex-type* modifiziert sind und damit ihrem natürlichen Gegenstücken sehr ähnlich sind, tragen nach Expression in Lepidopteren durch den Baculovirus lediglich paucimannosidische N-Glycane mit zwei bis drei Mannosen. Die Oligosaccharide können wie in Säugerzellen am proximalen GlcNAc in Stellung 6 aber auch an der Stelle 3 fucosyliert sein (Staudacher et al., 1992, Kubelka et al., 1993). Als Substrate für die  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase dienen

dabei sowohl die nicht fucosylierten als auch  $\alpha$ -1,6-monofucosylierten Intermediate (Staudacher und März, 1998, Hsu et al., 1997, Jäger et al., 1998). Wie Ackermann (1995) zeigen konnte, waren IL2-Mutanten nach der Expression in *Estigmene acrea* (BTI-EaA) auch zu geringen Anteilen mit einem, zwei oder drei terminalen GlcNAc-Resten modifiziert. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Ogonah et al. (1996) nach Analyse der N-Glycane des Interferon- $\gamma$ . Eine Auflistung der in verschiedenen Insektenzellen gefundenen N-Glycane verschiedener rekombinanter Proteine, die mit modernen komplementären Methoden wie HPAEC-PAD, MALDI/TOF-MS, ESI-MS und ESI-MS-MS detektiert wurden, ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Eine unabdingbare Voraussetzung für die Nutzung in bezug auf humantherapeutische Anwendung ist die Fähigkeit des Expressionssystems, daß die Proteine zu einem hohen Grad sialyliert werden. Dazu sind Insektenzellen nicht in der Lage, da ihnen zur Modifizierung mit NeuAc die modifizierenden Enzyme fehlen (Grabenhorst et al., 1999, Altmann et al., 1999, Hooker et al., 1999). Aber gerade hinsichtlich dieser Modifikation differieren die Meinungen verschiedener Arbeitsgruppen doch beträchtlich. So berichteten Davidson und Castellino (1990, 1991), daß der Anteil des sekretierten Modellproteins t-PA mit *complex-type* N-Glycanen zwischen 0-20 Stunden nach der Infektion 4 % Proteins ausmacht und im weiteren Infektionsverlauf zwischen 60-98 Stunden auf 92 % ansteigt. Keine Arbeitsgruppe konnte jemals diese Ergebnisse bestätigen. So untersuchten Donaldson et al. (1999) den Einfluß von verschiedenen Kulturbedingungen wie Ammoniumionen, Temperatur und eingetragenen Sauerstoff in die Kultur auf die Glycosylierung der humanen Alkalischen Phosphatase in High Five Zellen. Zusätzlich wurde der Einfluß der Infektionszeit in die Untersuchung mit einbezogen. Im Gegensatz zu den Arbeiten von Davidson und Castellino (1990, 1991) zeigten sie jedoch, daß keiner der untersuchten Prozeßparameter die Kapazität der Glycosylierung in den verwendeten Zelllinie signifikant beeinflusst.

Davis und Wood (1995) berichteten über sialylierte Strukturen der rekombinanten humanen Alkalischen Phosphatase in *Trichoplusia ni* Zellen und in Larven nach Baculovirusinfektion. Drei Jahre später wurden aber interessanterweise diese Ergebnisse von der gleichen Arbeitsgruppe widerrufen (Kulkosky et al., 1998).

Tabelle 1. N-Glycane verschiedener Insektenzelllinien aus rekombinanten Proteinen

N-Glycane ● Man, ■ Fuc, ▲ GlcNAc	Insektenzelllinie
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf21, Sf9), <i>Trichoplusia ni</i> (BTI Tn5B1-4, (High-Five), <i>Bombyx mori</i> (SPC-Bm36)
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf21, Sf9), <i>Trichoplusia ni</i> (BTI Tn5B1-4, (High-Five), <i>Bombyx mori</i> (SPC-Bm36)
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf21, Sf9), <i>Trichoplusia ni</i> (BTI Tn5B1-4, (High-Five), <i>Bombyx mori</i> (SPC-Bm36), <i>Mamestra brassicae</i> (IZD Mb0503), <i>Estigmene acrea</i> (BTI-EaA)
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf21, Sf9), <i>Trichoplusia ni</i> (BTI Tn5B1-4, (High-Five), <i>Bombyx mori</i> (SPC-Bm36), <i>Mamestra brassicae</i> (IZD Mb0503), <i>Estigmene acrea</i> (BTI-EaA)
	<i>Trichoplusia ni</i> (BTI Tn5B1-4, (High-Five), <i>Mamestra brassicae</i> (IZD Mb0503)
	<i>Trichoplusia ni</i> (BTI Tn5B1-4, (High-Five), <i>Mamestra brassicae</i> (IZD Mb0503)
	<i>Estigmene acrea</i> (BTI-EaA)
	<i>Estigmene acrea</i> (BTI-EaA)
	<i>Estigmene acrea</i> (BTI-EaA)

Während in der ersten Arbeit die Glycostrukturen über *lectin blotting* und sialylierte Strukturen mit dem Lectin *Sambucus nigra* Agglutinin identifiziert wurden, erfolgte die Detektion der N-Glycane in der zweiten Arbeit durch die FACE-Technologie (*fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis*). Diskutiert wurde das Vorhandensein von sialylierten Strukturen in der ersten Arbeit damit, daß durch die Immunpräzipitation sialylierte Fremdproteine Proteine mit gefällt werden, die dann durch das *lectin blotting* mit dem verwendeten Lectin *Sambucus nigra* Agglutinin einen falsch positiven Befund anzeigen. Zum anderen diskutieren sie, daß das *lectin blotting* wahrscheinlich kein Beweis für die Existenz von Sialostrukturen ist. Insgesamt scheinen sialylierte Strukturen immer dort detektiert zu werden, in denen die N-Glycan-Analyse mit indirekten Methoden wie dem *lectin blotting* durchgeführt wird. Sehr wahrscheinlich werden dann Serumproteine, die durch die Inokulation des Virusstocks mit eingetragen werden, in die Analyse mit einbezogen und geben den falsch positiven Befund (H.S.Conradt, E.Grabenhorst, pers. Mitteilung). Auch Altmann et al. (1999) vermutet, daß die gewählte Analysemethode von N-Glycanen einen starken Einfluß auf die detektierten Strukturen hat. So ist es auffällig, daß in den vergangenen Jahren mit den indirekten Methoden wie 2D-HPLC, *lectin blotting* und FACE-Analyse generell höhere Level an *complex-type* ähnlichen Strukturen wie die Anheftung von Lactosaminketten gefunden worden (Kubelka et al., 1993, 1994, Hsu et al., 1997). Hsu et al. (1997) ermittelten beispielsweise durch 2D-HPLC, daß das sekretorische IgG aus High Five Zellen zu 35 % N-Glycane mit *complex-type* Charakter aufwies. Die Strukturen besaßen die Zusammensetzung  $\text{Gal}_{0-1}\text{GlcNAc}_{1-2}\text{Man}_3\text{F}_{0-1}\text{GlcNAc}_2$ , wobei ca. 20 % Lactosaminketten aufwiesen. Sialylierte Strukturen wurden allerdings nicht ermittelt. Die Aussagekraft dieser Untersuchung ist aber sehr beschränkt, da durch die 2D-HPLC weder bifucosylierte Strukturen noch zweifach mannosylierte Glycane erfaßt werden können. In allen Untersuchungen der N-Glycane von verschiedenen rekombinanten Proteinen aus Insektenzellen durch Kombination von modernen komplementären Methoden der Massenspektrometrie und der HPAEC-PAD wurden neben geringen Mengen von  $\text{GlcNAcMan}_3\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  ausschließlich paucimannosidische Strukturen  $\text{Man}_{2-3}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  gefunden (Knepper et al., 1992,

Ackermann, 1995, Grabenhorst, 1994, Hooker et al., 1999). Damit zeigt sich eindeutig, daß die Analyse von N-Glykanen nur mit den komplementären modernen Methoden der Strukturanalyse möglich ist.

### **1.7. Das Modellprotein $\beta$ -Trace Protein ( $\beta$ -TP)**

Für die Analyse der Ursachen der Akkumulation rekombinanter sekretorischer Proteine in Baculovirus-infizierten Insektenzellen wird ein Modellprotein benötigt, mit dem man den sekretorischen Stoffwechselweg von Insektenzellen sowohl auf morphologischer als auch auf molekularer Ebene untersuchen kann. Das  $\beta$ -Trace Protein ( $\beta$ -TP) ist für die Analyse dieser Aufgabestellung hervorragend geeignet. Denn wie unter 1.6. (Synthese von sekretorischen Proteinen) beschrieben, werden im Verlauf der konstitutiven Sekretion ko- und posttranslational verschiedene Modifikationen ausgeführt. Bei dem  $\beta$ -TP erfolgen im Verlauf der Sekretion drei ganz entscheidende Modifikationen, die auf molekularer Ebene detailliert untersucht werden können:

- S     **die Signalpeptidabspaltung** (vergl. 1.6.1.)
- S     **die Bildung von Disulfidbrücken** (vergl. 1.6.2.)
- S     **und die N-Glycosylierung**. (vergl. 1.6.3.)

Anhand der detaillierten Analyse der ko- und posttranslationalen Modifikationen sollten mögliche Engpässe des sekretorischen Stoffwechselweges sichtbar werden.

Desweiteren standen Antikörper für das Modellprotein zur Verfügung, die immunhistochemische Untersuchungen wie Lokalisierungen des  $\beta$ -TP innerhalb der Zellen, Studien zur intrazellulären Kompartimentierung von sowohl nicht infizierten als infizierten Insektenzellen und Aufnahme von Produktbildungskinetiken ermöglichen. Ein weiterer Grund für die Verwendung des  $\beta$ -TP liegt in der hohen Expressionsrate in Baculovirus-infizierten Insektenzellen, was insgesamt die biochemische Analytik vereinfacht.

Bei dem verwendeten Modellprotein  $\beta$ -Trace-Protein ( $\beta$ -TP) handelt es sich um ein

konstitutiv sekretorisches Glycoprotein, das aus einem 168 Aminosäuren langen Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 18,7 kDa besteht. Anhand der Aminosäuresequenz wurde das  $\beta$ -TP als Prostaglandin D-Synthase identifiziert (Hoffmann et al. 1993).

*Aminosäuresequenz des  $\beta$ -TP:*

```

1      21      41      61      81      101      121      141      161
APEAQVSVQPNFQQDKFLGR WFSAGLASNSSWLREKKAAL SMCKSVVAPATDGG
LNLST FLRKNQCETRTMLLQPAGSL GSYSYRSPHWGSTYSVSVVE TDYDQYALL
YSQGSKGPGED FRMATLYSRTQTPRAELKEK FTAFCQAQGFTEDTIVFLPQ TDKC
MTEQ

```

Über die Anzahl der Disulfidbrücken bestehen unterschiedliche Angaben. Während von Link (1967) das Vorhandensein von zwei Disulfidbrücken analysierte geben Urade et al. (1995) und Nagata et al. (1991) eine Disulfidbrücke zwischen Cys<sub>67</sub> und Cys<sub>164</sub> (rot) an. Das  $\beta$ -TP ist eines der Hauptglycoprotein-Bestandteile der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), das an den Stellen Asn<sub>29</sub> und Asn<sub>56</sub> N-glycosyliert ist (blau gekennzeichnet in der Sequenz). Wie von Hoffmann et al. (1994) beschrieben, weist das  $\beta$ -TP eine von Serumproteinen abweichende gewebespezifische *brain-type* Glycosylierung auf, die durch einen hohen Anteil von Asialo-Agalacto, *bisecting* GlcNAc, quantitative proximale und eine hohe prozentuale periphere Fucosylierung (Lex, sLex) und einen geringen Sialysierungsgrad gekennzeichnet ist.

### 1.8. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Das Baculovirus-Expressionssystem stellt das zur Zeit wohl prominenteste transiente Expressionssystem dar und hat aufgrund seiner einfachen Handhabung und des geringen Zeitaufwandes, der benötigt wird, um mehrere hundert mg eines gewünschten Proteins zu produzieren, eine sehr große Verbreitung gefunden. Ein generelles Problem bei der Expression konstitutiv sekretorischer rekombinanter Proteine in diesem Expressionssystem stellt die intrazelluläre Akkumulation von

signifikanten Produktmengen dar, wobei der Anteil bis zu 90 % des insgesamt gebildeten rekombinanten Produktes ausmachen kann (siehe 1.5. Herstellung rekombinanter Proteine mit dem Baculovirus Expressionssystem). Die Ursachen für diese Akkumulation sind nicht bekannt, da es unter anderem bisher keiner Arbeitsgruppe gelang das jeweils intrazellulär akkumulierte rekombinante Protein quantitativ zu reinigen. Als Arbeitshypothese für Untersuchungen zu diesem Thema wurden und werden bestimmte Engpässe des sekretorischen Stoffwechselweges postuliert, die dann durch Koexpressionen mit vermeintlich insuffizient gebildeten prozessierenden Enzymen eliminiert werden sollen. Keine dieser Arbeiten konnte aber das Problem der intrazellulären Akkumulation rekombinanter sekretorischer Proteine in infizierten Insektenzellen durch solche *metabolic engineering* Ansätze lösen.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die biologischen und molekularen Ursachen für die Ausbildung des Akkumulationsphänomens untersucht werden. Für die Untersuchungen dieser Problematik ist das  $\beta$ -Trace Protein ( $\beta$ -TP) hervorragend als Modellprotein geeignet, da man bei diesem Protein den sekretorischen Stoffwechselweg auf biologischer und molekularer Ebene detailliert untersuchen kann (vergl. 1.6. Modellprotein  $\beta$ -Trace Protein ( $\beta$ -TP)). So sollte geklärt werden, ob durch die Baculovirusinfektion die intrazelluläre Kompartimentierung der Zellen im Verlauf der Infektion gestört wird und/oder ob durch die Kompromittierung des sekretorischen Stoffwechselweges durch den Virus einzelne ko- und posttranslationale Modifikationen bei dem verwendeten Modellprotein nicht mehr effizient ausgeführt werden. Anhand der erhaltenen Ergebnisse sollte geklärt werden, ob das Problem der Akkumulation rekombinanter sekretorischer Proteine überhaupt durch *metabolic engineering* Strategien gelöst werden kann. Insgesamt ergaben sich für die Untersuchung des Akkumulationsphänomens für die vorliegende Arbeit folgende Schwerpunkte, die sich in die morphologische und biochemische Analyse unterteilen lassen:

#### *Morphologische Analyse:*

- S Untersuchungen zur intrazellulären Kompartimentierung von nicht infizierten- und infizierten Insektenzellen durch Elektronenmikroskopie.



- S Immunhistochemische Lokalisierung des  $\beta$ -TP und Aufnahme von Produktbildungskinetiken durch Immunfluoreszenz- und Transmissions-elektronenmikroskopie.

*Biochemische Analyse:*

- S Proteinchemische Charakterisierung des intra- und extrazellulären  $\beta$ -TP durch SDS-PAGE/*western blotting* und Analyse der Bandenstruktur durch Kokultivierung mit Glycosylierungsinhibitoren.
- S Untersuchung der Biosynthese des  $\beta$ -TP durch SDS-PAGE/*western blotting* und durch *pulse-chase* Experimente.
- S Etablierung einer Reinigungsstrategie für das intrazellulär akkumulierte Modellprotein, die eine Grundvoraussetzung für die anschließende Analyse der ko- und posttranslationalen Modifikationen darstellt.
- S Detaillierte Analyse der ko- und posttranslationalen Modifikationen mit komplementären chromatographischen und massenspektrometrischen *mapping*-Verfahren (HPAEC-PAD, MALDI/TOF-MS, ESI-MS, ESI-MS-MS) und durch N-terminale Sequenzanalyse.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Zelllinien und Virus**

#### **2.1.1. IPLB-Sf21AE (Sf21)**

Die Zelllinie stammt aus den Ovarien der Lepidopteren Art *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). Sie wurde 1977 von Vaughn et al. etabliert. Bezogen wurde sie von Frau S. Gonski (Aventis, Frankfurt am Main).

#### **2.1.2. Sf9**

Bei der Zelllinie Sf9 handelt es sich um einen Klon der Zelllinie IPLB Sf21 AE (s.o.), der von Smith et al. 1985 speziell als Wirtszelle für Baculoviren kloniert wurde. Die verwendeten Sf9 Zellen stammen von der ATCC (ATCC CRL 1711).

#### **2.1.3. BTI Tn5B1-4 (*High Five*<sup>TM</sup>)**

Die Zelllinie BTI Tn5B1-4 (*High Five*<sup>TM</sup>) wurde von Granados aus den Ovarien aus *Trichoplusia ni* isoliert und von Davis et al. (1993), Wickham et al. (1992) und Wickham und Nemerow (1993) bezüglich rekombinanter Produktexpression untersucht. Sie wurde von der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) bezogen.

#### **2.1.4. AcMNPV-, -TP**

Durch homologe Kotransfektion der Wildtyp-Baculovirus-DNA mit dem Plasmid pVL1393 wurde das rekombinante Virus von Grabenhorst 1994 hergestellt. Hierfür wurde das , -TP-Gen (Plasmid pMT7T3-f<sub>1</sub>-β-TP (Gross, unveröffentlicht) in das Plasmid pVL1393 kloniert und das Polyhedrin-Gen des Baculovirus gegen das für , -TP codierende Gen des Plasmids ausgetauscht. Das Virus wurde freundlicherweise von Herrn E. Grabenhorst (GBF, Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

### **2.2 Medien und Mediensupplemente**

Die Medien wurden mit hochreinem Wasser (Milli-Q-Wasser-Filtrationsystem, Millipore, Eschborn) angesetzt. Nach vollständiger Auflösung des Mediums und der

entsprechenden Supplemente wurde der pH-Wert mit 5 N NaOH (Merck, Darmstadt) auf 6,2 eingestellt. Anschließend erfolgte eine Sterilfiltration (Mediakap™-10 Hollow Fiber Filter 0,2 µM, Microgon, Laguna Hills, CA, USA) an die sich ein 48-stündiger Steriltest bei 27°C im Brutraum anschloß.

### **2.2.1. T-Ex-Cell 401 (TEX)**

T-Ex-Cell 401 ist ein semidefiniertes, serumfreies Medium, das aus dem pulverförmigen Fertigmedium Ex-Cell 401 (JRH Bioscience, Woodland, CA, USA) unter Supplementierung von 0,35 g l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> (Sigma, St.Louis, MO, USA), 4,35 g l<sup>-1</sup> Glucosemonohydrat (Merck, Darmstadt), 1,32 g l<sup>-1</sup> L-Glutamin (Fluka, Buchs, Schweiz) und 1,05 g l<sup>-1</sup> Asparagin (Serva, Heidelberg) hergestellt wurde.

### **2.2.2. TC100/TB + 10 % FCS**

TC100 ist ein kommerziell erhältliches Pulvermedium (Gibco BRL, Eggenstein). Pro Liter Medium wurden 0,35 g NaHCO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt), 2,5 g Tryptose-Pulver (Sigma, St.Louis, MO, USA), 1,7 g Glucosemonohydrat (Merck, Darmstadt) und 100 ml FCS (Sigma) supplementiert.

### **2.2.3. MMEM (MES-gepuffertes MEM)**

Als Basalmedium für *pulse-chase* Experimente diente das Flüssigmedium MEM ohne Methionin/Cystein mit Earles Salzen der Firma Sigma (St.Louis, MO, USA), das ursprünglich für HeLa-Zellen entwickelt wurde. Zu diesem Minimalmedium wurden pro Liter folgende Supplemente zugegeben: 0,4 g KCl (Sigma), 0,413 g MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O (Fluka, Buchs, Schweiz), 1,10 g NaHCO<sub>3</sub> (Sigma), 0,67 g L-Glutamin (Fluka), 2,17 g Glucosemonohydrat (Merck, Darmstadt), 0,65 g L Asparagin (Fluka), 0,65 g L-Asparaginsäure (Fluka), 0,75 g Glutaminsäure (Fluka), 0,1 g Glycin (Fluka), 0,25 g Prolin (Fluka) und 0,97 g 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) (Sigma).

#### **2.2.4. Fötales Kälberserum (FCS)**

Das als Mediensupplement verwendete Serum wurde von der Firma Sigma (St.Louis, MO, USA) bezogen. Nach dem Auftauen wurde das Serum zur Inaktivierung von Faktoren des Komplementsystems für eine Stunde bei 56 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

#### **2.3. Revitalisieren von Insektenzellen**

Die in der Dampfphase über flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden bei 27 °C für 2 min im Wasserbad aufgetaut und das Einfrierröhrchen (Nunc, Wiesbaden) mit 70 % Ethanol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) desinfiziert. Dann wurden die Zellen in 20 ml TEX + 10 % FCS überführt und bei 800 g 3 min (Digifuge<sup>GL</sup> 2200, Heraeus, Osterode) abzentrifugiert. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Zellen wurden dann in 50 ml FCS-haltigem TEX bei 27 °C in 125 ml Spinnerflaschen (Techne, Cambridge, England) kultiviert. Die Adaptierung an serumfreies Medium erfolgte über vier Passagen durch schrittweise Reduzierung der Serumkonzentration.

#### **2.4. Kultivierung von Insektenzellen**

Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter Laminar-Flow-Arbeitsbänken der Sicherheitsstufe 2 (Laminar HBB2472S, Heraeus, Hanau) durchgeführt.

##### **2.4.1. Suspensionskultur**

###### *Stammhaltung*

Da die Passagierung von Suspensionszellen wesentlich einfacher ist als die von adhärenenten Kulturen, wurde die Stammhaltung der verwendeten Zelllinien vorwiegend in Suspension durchgeführt. Die beiden Zelllinien wurden in 50 ml (Sf21) bzw. 100 ml Suspensionskulturen (High Five) in 125 ml und 500 ml Spinnerflaschen (Techne, Cambridge, GB) bei 80 rpm und 130 rpm gehalten. Die Passagierung erfolgte zweimal wöchentlich. Hierfür wurde die Zellzahl in der Zählkammer nach Neubauer ermittelt, und dann eine solche Menge Zellsuspension durch frisches Medium ersetzt, daß sich,

eine Zelldichte von  $3 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$  eingestellte. Anschließend wurden die Zellen bei 27 °C im Brutraum inkubiert.

### *Kultivierung*

Je nach benötigter Menge an Zellen oder rekombinantem Protein wurden unterschiedliche Kultivierungsgefäße verwendet.

Neben den 125 ml und 500 ml Spinnerflaschen (s.o.) mit Oberflächenbegasung kam für benötigte größere Mengen von Zellen, Viren oder rekombinantem Produkt der SuperSpinner von B. Braun (Melsungen) mit blasenfreier Membranbegasung und Magnetpendelrührer zum Einsatz. Dabei handelt es sich um einen 1-Liter Spinnerflasche mit Membranrührer und Hohlfasermembran zur schonenden Durchmischung und blasenfreien Sauerstoffbegasung (Accurel® S6/2, Innendurchmesser: 1,8 mm; Außendurchmesser: 2,6 mm, mittlere Porenweite: 0,3 µm, Enka AG, Wuppertal). Die blasenfreie Membranbegasung ist für Säugerzellen von Lehmann et al. (1985 und 1987) und Heidemann et al. (1994) beschrieben. Jäger und Kobold (1995) zeigten den effizienten Einsatz von SuperSpinners zur Produktion rekombinanter Proteine aus Baculovirus-infizierten Sf9 Insektenzellen.

### **2.4.2. Adhärenente Kultur**

Für immuncytochemische Experimente wurden vorwiegend adhärenente Kulturen verwendet, die aus den Suspensionskulturen erstellt wurden. Die Kultivierung erfolgte dazu in 25 cm<sup>2</sup> und in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg). Aus Suspensionskulturen entnommene Zellen wurden in einer Kulturflasche ausgesät, und zweitägig wurde ein Medienwechsel (TEX + 10 % FCS) durchgeführt, wodurch die nicht adhärenenten Zellen entfernt wurden. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte die Passagierung der Zellen. Dazu wurden sie durch mehrfaches Einsaugen und Ausblasen von 5 ml (kleine Kulturflasche) bzw. 15 ml (große Kulturflasche) TEX + 10 % FCS mit einer Pipettierhilfe von der Oberfläche abgelöst, vereinzelt und gezählt. Die Kulturflaschen wurden dann mit folgenden Dichten angeimpft:

- S 25 ml-Kulturflasche:  $1 \times 10^6$  Zellen pro Kulturflasche ( $4 \times 10^4$  Zellen  $\text{cm}^{-2}$ ) Endvolumen: 7,5 ml TEX + 10 % FCS
- S 75 ml-Kulturflasche:  $3 \times 10^6$  Zellen pro Kulturflasche ( $4 \times 10^4$  Zellen  $\text{cm}^{-2}$ ) Endvolumen: 20 ml TEX + 10 % FCS

### *Beschichtung von Oberflächen mit Poly-L-Lysin*

Für immuncytochemische Experimente und Radioaktivmarkierungen wurden die Oberflächen von Glascoverslips (Omnilab, BLB, Braunschweig) und 6-Lochplatten (Becton Dickinson, Heidelberg) vor dem Aussähen der Zellen mit Poly-L-Lysin (Sigma, St.Louis, MO, USA) beschichtet, um eine gute Anheftung der Zellen an die Oberflächen zu erreichen. Dazu wurde eine 0,1 %-ige (v/v) Poly-L-Lysinlösung (Sigma) mit Milli-Q-Wasser 1:10 verdünnt und sterilfiltriert (Spritzenvorsatz Millex-GS, 0,22  $\mu\text{m}$  Membran, Millipore, Molsheim, Frankreich). Diese wurde dann für 15 Minuten auf die zu beschichtende Oberfläche gegeben. Die Glascoverslips wurden anschließend dreimal für 10 Minuten mit sterilem Milli-Q-Wasser gewaschen und mit Zellen beimpft.

### **2.4.3. Infektion von Insektenzellen**

Für die Infektion wurde nach Zellzahlbestimmung die entsprechende Menge Virusstock, je nach verwendeter *multiplicity of infection* MOI, in die Kultur inokuliert (MOI = Anzahl der infektiöser Viren pro Zelle). Rekombinante Produktexpressionen wurden in 100 ml Suspensionskulturen mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  in 500 ml Spinnerflaschen (siehe 2.4.1.) durchgeführt.

### **2.4.4. Herstellung des Virusstocks**

Um virusstockspezifische Unterschiede bei den Versuchen auszuschließen, wurde ein großer Virusstock von 2000 ml angelegt, mit dem alle Versuche durchgeführt wurden. Dazu wurden die Zellen für die Virusvermehrung 10 Tage in TEX + 10 % FCS in einer 500 ml Spinnerflasche kultiviert. Dann wurden die Zellen 10 min bei 1000 g abzentrifugiert (Digifuge<sup>GL</sup> 2200, Heraeus, Osterode), in serumfreiem TEX resuspen-

diert und in einen Superspinner mit Membranbegasung (siehe 2.4.) überführt. Das Kulturvolumen betrug 1000 ml bei einer Animpfdichte von  $5 \times 10^5$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ . Dann erfolgte die Infektion der Zellen mit AcMNPV-, -TP bei einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,5. Nach fünftägiger Inkubation wurde der Überstand durch einen Zentrifugationsschritt geerntet (10 min bei 3000 g). Der Virustiter wurde mittels Plaque Assay (siehe 2.5.4.) ermittelt ( $2 \times 10^7$  *plaque forming units* (PFU)  $\text{ml}^{-1}$ ) und dann bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

#### **2.4.5. Radioaktive Markierung von Baculovirus-infizierten Insektenzellen**

Für die Verfolgung der Sekretionskinetik rekombinanter Proteine in Baculovirus-infizierten Insektenzellen wurde ein *pulse-chase* Experiment durchgeführt. Dazu wurden pro Loch einer zuvor mit Poly-L-Lysin-beschichteten 6-Lochplatte (Becton Dickinson, Heidelberg) (s.o.)  $2 \times 10^6$  Insektenzellen in 2 ml TEX ausgesät und mit rekombinanten AcMNPV-, -TP mit einer MOI = 5 infiziert. Nach entsprechenden Zeitpunkten p.i. wurde das Medium entfernt, die Zellen jeweils zweimal mit 1 ml MMEM gewaschen und anschließend für 2 h mit jeweils 1 ml MMEM bei 27 °C inkubiert. Die Insektenzellen wurden dann mit  $250 \mu\text{Ci ml}^{-1}$   $^{35}\text{S}$ -Methionin (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) für 5 Minuten markiert (*pulse*). Nach diesem Puls wurde das Medium entfernt, einmal mit TEX gewaschen und dann mit 1 ml TEX bei 27 °C inkubiert (*chase*). Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte eine Probenahme. Dazu wurde der Überstand von der 6-Lochplatte abgesaugt und die Partikel bzw. Membranbruchstücke bei 13000 g entfernt (Biofuge pico, Heraeus, Osterode). Die Zellen wurden mit 1 ml TEX gewaschen, dann mit 1 ml Lysatpuffer versetzt und mit einer Pipette von der Oberfläche der Platte abgespült. Diese Zellsuspension wurde 1 min mit 50 W Ultraschall (3200 Branson, BLB, Braunschweig) homogenisiert und danach 1 Stunde bei 37 °C mit jeweils  $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  DNase I (Roche, Basel, Schweiz) und RNase A (Roche) verdaut. Dann erfolgte die Abtrennung von den unlöslichen Bestandteilen der Präparation durch 10 minütige Zentrifugation bei 13000 g (Biofuge pico, Heraeus). Die so gewonnenen Überstände wurden schließlich durch Affinitätschromatographie gereinigt, die markierte Menge durch Flüssigkeitsszintillationsmessung bestimmt

(Beckman LS 6000 IC, Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) und durch SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie das  $\beta$ -TP analysiert (siehe 2.14.1.2.) .

Lysatpuffer: 50 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl (Sigma), 0,5 % (v/v) Triton X-100 (Sigma), 1mmol l<sup>-1</sup> EDTA (Serva, Heidelberg), 50  $\mu$ mol l<sup>-1</sup> Antipain (Bachem, Bubendorf, Schweiz), pH 7,5

## **2.5. Prozeßanalytik**

### **2.5.1. Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit dem Farbstoff Trypanblau in der verbesserten Zählkammer nach Neubauer (Omnilab, BLB, Braunschweig). Dazu wurden die Zellsuspensionen 1:2 bzw. bei größeren Zellkonzentrationen 1:10 mit 0,5%-iger Trypanblaulösung (Roth, Karlsruhe) pipettiert und unter dem Mikroskop (Inversmikroskop Diaphot, Nikon, Düsseldorf) bei 200-facher Vergrößerung gezählt. Da der Farbstoff nur in tote Zellen (nekrotische) eindringt, kann man gut zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden (Walford et al. 1964).

### **2.5.2 Quantitative Bestimmung von Glucose und Lactat**

Die Messung der Glucose- und Lactatkonzentration in Kulturüberständen erfolgte mit dem automatischen Glucose/Lactat Analysator (YSI, Modell 2700, Yellow Springs, OH, USA) mit interner Kalibriervorrichtung. Grundlage der Messung ist ein elektrochemisch gekoppelter Prozeß, bei dem , -D-Glucose bzw. L-Lactat unter Beteiligung von Sauerstoff durch die auf die Membranen immobilisierten Enzyme Glucoseoxidase und Lactatoxidase zu Glucono-l -Lacton und Pyruvat umgesetzt werden. Das dabei entstehende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird dann mit Pt/Ag, AgCl-Elektroden detektiert.

### **2.5.3. Quantitative Bestimmung freier Aminosäuren**

Die Bestimmung der Konzentrationen von freien Aminosäuren erfolgte nach Derivatisierung durch Reversed-Phase-HPLC (System 450 MT2, Kontron Instruments, Hamburg) an einer AminoOPA-Säule (3  $\mu$ m Säule von Grom, Herrenberg) und anschließender Detektion mittels eines Fluoreszenzspektrometers (SFM 25, Kontron



Instruments, Hamburg). Zur Vorbereitung wurden die Proben nach Proteinfällung durch Perchlorsäure (Merck, Darmstadt) mit Sulfosalicylsäure (Fluka, Buchs, Schweiz) in Gegenwart von Mercaptopropionsäure (Fluka) mit o-Phthaldialdehyd (Serva, Heidelberg) umgesetzt, so daß fluoreszenzfähige Isoindolderivate gebildet werden (Cronin & Hare 1977).

#### **2.5.4. Bestimmung des Virus-Titers mittels Plaque-Assay**

Zur Bestimmung der Anzahl vermehrungsfähiger Viren wurde der von Brown und Faulkner (1977) entwickelte Plaque Assay verwendet. Aus einer Sf21-Suspensionskultur wurde in jedes Loch einer 6-Lochplatte (Becton Dickinson, Heidelberg) ein Milliliter einer Zellsuspension von  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  ausgesät und zum Anheften der Zellen 2 h bei 27 °C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe des Virusstocks in 10er Verdünnungsschritten von  $10^{-4}$  bis  $10^{-9}$  (mit TC100 + 10 % FCS). Bei guter Adhäsion der Zellen wurde das Medium nach zweistündiger Inkubation abgesaugt und 500 µl der Verdünnungsreihe vorsichtig in jedes Loch pipettiert. Nach weiterer Inkubation für 1,5 Stunden bei 27 °C erfolgte die Überschichtung mit 2 ml einer temperierten (40 °C) 1:2 Mischung aus 3 %-iger Low Melting Agarose (Serva, Heidelberg) und doppelt konzentriertem TC100 + 10% FCS Medium. Zum Schutz vor Austrocknung wurde die erstarrte Agarose mit 1 ml Medium überschichtet und dann die 6-Lochplatte 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt und die Plaques mit 300 µl einer sterilen 0,1 %-igen Neutralrotlösung (Sigma, St.Louis, MO, USA) angefärbt, welche nach einer Stunde wieder entfernt wurde. Da Neutralrot die lebenden Zellen selektiv rot anfärbt, sind die Plaques als helle Flecken auf der Platte zu erkennen. Der Virustiter errechnet sich dann wie folgt:

$$\text{PFU ml}^{-1} = \text{Zahl der gezählten Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{eingesetztes Volumen}^{-1}$$

## 2.6. Zellaufschluß

$1 \times 10^8$  Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 800 g (Digifuge<sup>GL</sup> 2200, Heraeus, Osterode) vom Kulturüberstand abgetrennt, das Pellet in 5 ml Lysatpuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Mit Hilfe eines Homogenisators (Potter L, Omnilab, BLB, Braunschweig) erfolgte die Zertrümmerung der Zellen, an die sich ein einstündiger Verdau mit je  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  RNase A (Roche, Basel, Schweiz) und DNase I (Roche) bei 37 °C anschloß. Die Kerne und Zellmembranbruchstücke wurden danach bei 1000 g (Digifuge<sup>GL</sup> 2200) abgetrennt. Der Überstand wurde dann direkt durch SDS/PAGE (siehe 2.14.1) analysiert oder weiter über entsprechende Reinigungsstrategien gereinigt.

Lysatpuffer:	50 mmol l <sup>-1</sup> Tris-HCl (Sigma, St.Louis, MO, USA), 0,5 % (v/v) Triton X-100 (Sigma), 1mmol l <sup>-1</sup> EDTA (Serva, Heidelberg), 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Antipain (Bachem, Bubendorf, Schweiz), pH-Wert 7,5
--------------	---

## 2.7. Konzentrierung von Proteinen

### 2.7.1. Speed Vac Konzentrator

Zur Konzentrierung von wäßrigen Proben bzw. zum Wechseln von Lösungsmitteln wurde der Speed Vac Concentrator (Savant Instruments, Inc., Hicksville, NY, USA) benutzt. Hierfür wurden die Proben in Eppendorfreaktionsgefäßen (1,5 oder 2 ml, Eppendorf, Hamburg) pipettiert und anschließend unter ständiger Rotation der Proben das Lösungsmittel im Vakuum im Speed Vac Concentrator entfernt.

### 2.7.2. Ultrazentrifugation

Der Überstand nach dem Zellaufschluß (2.6.) wurde durch Zentrifugation für 1 h bei 100000 g (Rotor TL-100.3, TL-100 Ultrazentrifuge, Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) in eine cytosolische Fraktion (UZÜ) und eine Membranfraktion (UZP) getrennt.

### 2.7.3. Ultrafiltration

Zu konzentrierende proteinhaltige Lösungen wurden mit MACROSEP™ Zentrifugenkonzentratoren (Filtron, Pall Filtron Corporation, Northborough, MA, USA) mit einem *cut off* von 3 oder 10 kDa bei 3500 g in einer Zentrifuge (Cryofuge 8000, Heraeus-Christ, Karlsruhe) bei 4 °C nach dem Prinzip der Membranseparation konzentriert.

### 2.7.4. Ethanolfällung

Proteinhaltige Lösungen wurden mit dem 5-fachen Volumen Ethanol (J.T.Baker, Deventer, Niederlande), das zuvor auf -20 °C gekühlt wurde, für 2 Stunden bei -20 °C gefällt. Dann erfolgte eine Zentrifugation (Biofuge pico, Heraeus, Osterode), wonach das Pellet in dem entsprechenden Puffer aufgenommen wurde.

### 2.7.5. Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung)

Zuvor auf Eis gekühlte proteinhaltige Überstände wurden mit einer 40 %-igen (w/v) TCA-Lösung (Sigma, St.Louis, MO, USA), die ebenfalls auf Eis temperiert wurde, versetzt, so daß sich eine Endkonzentration von 20 % (w/v) ergab. Dieser Ansatz wurde auf Eis 2 Stunden inkubiert, der Niederschlag abzentrifugiert (Mikroliter Zentrifuge Typ 2043, Hettich, Tuttlingen), das Pellet mit Ethanol (J.T.Baker, Deventer, Niederlande) neutral gewaschen und in einen entsprechenden Puffer für die weitere Verarbeitung aufgenommen.

### 2.7.6. Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation der [<sup>35</sup>S]-markierten zellfreien, -TP-Proben wurden 1 ml Aliquots mit 5 µl, -TP-Antiserum und 100 µl 10 x IP-Puffer versetzt und 30 min bei Raumtemperatur, dann 1 h im Eisbad inkubiert. In der Zwischenzeit wurden pro Ansatz 10 mg Protein-A-Sepharose CL-4B (Serva, Heidelberg) in 100 µl IP-Puffer vorsichtig suspendiert und 1 h auf Eis äquilibriert. Der erste Ansatz wurde dann in die Sepharosesuspension gegeben und 2 h auf Eis unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes durch dreiminütige Zentrifugation (Mikroliter

Zentrifuge Typ 2043, Hettich, Tuttlingen) bei 2000 g wurde die Sepharose einmal mit IP-Puffer, zweimal mit Waschpuffer I und einmal mit Waschpuffer II gewaschen und dann mit SDS-Probenpuffer (siehe SDS-PAGE) 5 min bei 95 °C (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg) gekocht. Die so gewonnenen Proben wurden durch SDS-PAGE analysiert.

#### *Lösungen:*

Antikörper:	anti-, -TP Serum aus Kaninchen (H.S. Conradt, GBF, Braunschweig)
IP-Puffer:	20 mmol l <sup>-1</sup> Tris-HCl (Sigma, St.Louis, MO, USA), 140 mmol l <sup>-1</sup> NaCl (Serva, Heidelberg), 5 mmol l <sup>-1</sup> EDTA (Serva), 1 % (v/v) Triton X-100 (Sigma), 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat (Serva) pH 7,6
10 x IP-Puffer:	200 mmol l <sup>-1</sup> Tris-HCl (Sigma), 1400 mmol l <sup>-1</sup> NaCl (Serva), 50 mmol l <sup>-1</sup> EDTA (Serva), 10 % (v/v) Triton X-100 (Sigma), 5 % (w/v) Natriumdesoxycholat (Serva) pH 7,6
Waschpuffer I:	1 % (v/v) Nonidet P-40 (Sigma), 50 mmol l <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fluka, Buchs, Schweiz), pH 7,0
Waschpuffer II:	50 mmol l <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fluka), pH 7,0

#### **2.7.7. Chloroform-Methanol-Extraktion**

Zur Entfernung von Lipiden, die die Analytik von Proteinen stören, erfolgte eine Lipidextraktion mit Chloroform und Methanol. Dazu wurde ein auf Eis gekühltes Proteinpellet mit einer eiskalten Chloroform/Methanol-Mischung von 2:1 mit einem Massenverhältnis von 1:20 versetzt und 1 Stunde auf Eis extrahiert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Vorgang ein weiteres Mal wiederholt.

#### **2.8. Gelpermeationschromatographie**

330 ml Sephacryl S 300 HR-Gelsuspension (Partikelgröße 25-75 µm, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurden ad 500 ml mit Äquilibrationpuffer gefüllt, gut durchmischt und für eine Stunde unter Wasserstrahlvakuum entgast. Nachdem das

Säulenmaterial in die Gelfiltrationssäule (XK26/100 Niederdrucksäule, Amersham Pharmacia Biotech) gegossen war, erfolgte das Packen der Säule für 3 Stunden bei einer Flußrate von  $3 \text{ ml min}^{-1}$ , worauf sich dann ein weiterer Äquilibrationsschritt für 2 Stunden bei  $6 \text{ ml min}^{-1}$  anschloß.

Die Proben wurden in eine 5 ml-Schleife injiziert, mit einer Flußrate von  $0,5\text{-}1 \text{ ml min}^{-1}$  auf die Säule appliziert und mit Elutionspuffer bei derselben Flußrate chromatographiert. Das Elutionsprofil wurde durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm (LKB+UV-MII Detektor, Amersham Pharmacia Biotech) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software FPLC-Direktor Version 1.03 (Amersham Pharmacia Biotech).

#### *Elutionspuffer:*

50 mmol  $\text{l}^{-1}$  Tris-HCl (Sigma, St.Louis, MO, USA), 150 mmol  $\text{l}^{-1}$  NaCl (Serva, Heidelberg), 1 mmol  $\text{l}^{-1}$  EDTA (Serva) pH 7,5

## **2.9. Affinitätschromatographie**

### *Reinigung von bis zu 1 mg , -TP*

Die Aufreinigung von , TP-haltigen Zellkulturüberständen und intrazellulär vorgereinigten Proben erfolgte durch Immunaффinitätschromatographie. Als Matrix diente Affigel 15 (BioRad, München), an die ein monoklonaler , -TP-Antikörper (Y248D9 IgG<sub>2a</sub>, Hoffmann, 1992) gebunden war (Bindungskapazität  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  Matrix). 5 ml dieser Matrix-Suspension wurden in eine Säule gegeben und bei einer Flußrate von  $4 \text{ ml min}^{-1}$  mit PBS äquilibriert. Das Chromatogramm wurde bei 280 nm mit Hilfe eines UV-Detektors (LKB\*UV-MII Detektor, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgenommen.

Zur affinitätschromatographischen Reinigung wurden die Überstände 1:2 mit PBS gemischt und bei einer Flußrate von  $1\text{-}2 \text{ ml min}^{-1}$  auf die Säule gegeben. Nach der Probenauftragung wurde mit PBS gewaschen (Flußrate  $4 \text{ ml min}^{-1}$ ) und dann mit 0,5 ml

min<sup>-1</sup> mit Elutionspuffer das , TP von der Säule gewaschen, neutralisiert und in der Speed Vac bis zur Trockne eingeeengt (Savant Instruments, Inc., Hicksville, NY, USA).

PBS: 150 mmol l<sup>-1</sup> NaCl (Serva, Heidelberg), 8 mmol l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fluka, Buchs, Schweiz), 3 mmol l<sup>-1</sup> KCl (Fluka) 1,5 mmol l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fluka), 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt) pH 7,4

Elutionspuffer: 0,1 mol l<sup>-1</sup> Glycin (Merck), 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub> pH 2,5

#### *Reinigung von bis zu 200 µg , -TP*

Die Reinigung erfolgte prinzipiell in der gleichen Art und Weise wie oben beschrieben. 200-400 µl Matrixlösung wurden in eine Minisäule (BioRad, München) gegeben und 3 mal mit 1 ml PBS äquilibriert. Dann erfolgte die Auftragung der mit PBS gemischten Probe. Es erwies sich dabei als vorteilhaft, die Probe ein zweites Mal über die Säule laufen zu lassen. Danach erfolgte das Waschen der Säule 5 mal mit 1 ml PBS. Anschließend wurde die Säule am unteren Ende verschlossen und mit 500 µl Elutionspuffer für 5 min inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Säule geöffnet und zwei weitere Male mit 500 µl Elutionspuffer eluiert. Die Regenerierung der Säule erfolgte durch Waschen mit 5 mal 1 ml PBS. Die Proben wurden in der Speed Vac eingeeengt, ad 250 µl mit Wasser aufgefüllt und mit Ethanol gefällt.

## **2.10. Entsalzung**

### **2.10.1. Entsalzung von Proteinen durch Dialyse**

Entsprechende proteinhaltige Lösungen wurden bei 4 °C in den für die jeweilige Applikation benötigten Puffer überführt. Das Volumen des Dialysepuffers betrug jeweils mindestens das 350-fache des Probenvolumens. Die Dialyse erfolgte im Dialyseschlauch VISKING aus regenerierter Cellulose (10-20 kDa, Typ 8/32, Roth, Karlsruhe) gegen 1 % (v/v) Essigsäure (J.T.Baker, Deventer, Niederlande) über Nacht. Dann wurden die Proben mit 12,5 %-iger (v/v) NH<sub>3</sub>-Lösung (Merck, Darmstadt) neutralisiert, in der Speed Vac (Savant Instruments, Inc., Hicksville, NY, USA) eingeeengt und in Puffer aufgenommen.

### 2.10.2. Entsalzung und Reinigung von Peptiden mit RP-18-Kartuschen

Tryptische Peptide bzw. Glycopeptide wurden mit kleinen RP-18-Kartuschen (Millipore, S.A., Molsheim, Frankreich) gereinigt. Dazu wurde die Kartusche einmal mit 2 ml 40 % (v/v) Acetonitril / 0,5 % (v/v) Ameisensäure (J.T.Baker, Deventer, Niederlande) gewaschen und dann 3 mal mit 2 ml einer 0,5 % (v/v)-igen Ameisensäurelösung (J.T.Baker) äquilibriert. Anschließend erfolgte die Auftragung der Probe. Dann wurde wiederum 3 mal mit 5 ml 0,5 % (v/v)-iger Ameisensäure gewaschen und die Probe mit 3 mal 2 ml 40 % (v/v) Acetonitril / 0,5 % (v/v) Essigsäure (J.T.Baker) von der Säule eluiert. Die Proben wurden eingengt, in 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (J.T.Baker) aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

### 2.10.3 Entsalzung von N-Glycanen

#### *Entsalzung durch Gelpermeationschromatographie*

Die Oligosaccharid-haltigen RP-HPLC-Fraktionen wurden vereinigt, mit 12,5 %-iger (v/v)  $\text{NH}_3$ -Lösung (Merck, Darmstadt) neutralisiert und bis zur Trockne eingengt (Speed Vac Concentrator, Savant Instruments, Inc., Hicksville, NY, USA). Das Pellet wurde in 700  $\mu\text{l}$  bidest. Wasser aufgelöst, auf eine Entsalzungssäule gegeben (Fast Desalting, 20-50  $\mu\text{m}$  Detranpartikel, 1 x 10 cm, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und mit bidest. Wasser bei einer Flußrate von 1  $\text{ml min}^{-1}$  eluiert. Die Fraktionen 4 -16 (0,5 ml Fraktionen) wurden vereinigt, konzentriert, zur weiteren Verwendung in 500  $\mu\text{l}$  bidest. Wasser resolubilisiert und dann bei -20 °C gelagert. Als FPLC-System diente der Pharmacia Liquid Chromatography Controller LCC500 (Amersham Pharmacia Biotech). Die photometrische Detektion erfolgte bei 206 nm.

#### *Entsalzung mit Hypercap-Kartuschen*

Alternativ zu der oben beschriebenen Methode erfolgte die Entsalzung an Graphit-Kartuschen (Hypercap, 25 mg Kartusche, Thermoquest, Egelsbach). Hierfür wurde die Kartusche 3 mal mit 1 ml 80 % (v/v) Acetonitril / 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (J.T.Baker, Deventer, Niederlande) gespült und anschließend mit bidest. Wasser neutral gewaschen. Dann wurden 100-200  $\mu\text{l}$  Probe aufgegeben, 3 mal mit 1 ml bidest.

Wasser gewaschen und abschließend mit 40 % (v/v) Acetonitril (J.T.Baker) eluiert. Die Proben wurden bis zur Trockne eingeeengt, in bidest. Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

## **2.11. Denaturierung, Reduktion, Carboxamidomethylierung und tryptische Spaltung von Proteinen**

### **2.11.1 Denaturierung**

Für die Denaturierung wurden 0,25 - 5 mg Protein in 1 ml 100 mmol l<sup>-1</sup> Tris (pH 8,5) (Sigma, St. Louis, MO, USA) gelöst und in 7 mol l<sup>-1</sup> Guanidin-HCl (Sigma) versetzt und der pH-Wert mit 12,5 %-iger Ammoniaklösung (Merck, Darmstadt) auf 8,5 eingestellt.

### **2.11.2. Reduktion**

Die Reduzierung der Disulfidbrücken erfolgte durch Zugabe von 1 mmol l<sup>-1</sup> DTE (Sigma, St.Louis, MO, USA) zu den zuvor denaturierten Proben (s.o.). Dann wurde der pH-Wert mit 12,5 %-iger Ammoniaklösung auf 8,5 eingestellt und der Ansatz 2 Stunden bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.

### **2.11.3. Carboxamidomethylierung**

Freie Thiolgruppen von Proteinen oder durch vorhergehende Reduktion entstandene SH-Gruppen (s.o.) wurden durch Jodacetamid zu dem stabilen Carboxamidomethyl-Cystein (CM-Cystein) alkyliert. Hierfür wurden 0,25 - 5 mg Protein in 100 mmol l<sup>-1</sup> Tris pH 8,5 (Sigma, St.Louis, MO, USA) mit 5 mmol l<sup>-1</sup> Jodacetamid (Sigma) versetzt und im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde abgebrochen, wenn mit Ellmanns Reagenz kein freies DTE mehr nachgewiesen werden konnte (Ellmann, 1958). Anschließend wurde über Nacht dialysiert (siehe 2.10.1).



#### 2.11.4. Tryptischer Verdau

Für eine bessere Zugänglichkeit der Serinprotease wurden alle Proben je nach Fragestellung vorher denaturiert, reduziert und alkyliert bzw. für die Disulfidbrückenanalytik lediglich denaturiert und carboxamidomethyliert. Die proteolytische Spaltung erfolgte in 100 mmol l<sup>-1</sup> Tris (Sigma, St.Louis, MO, USA) pH 8,5 durch 2 % (w/v) Trypsin (*sequencing grade*, Roche, Basel, Schweiz) für mindestens 6 Stunden bei 37 °C im Wasserbad (mgw LAUDA, M3, Königshofen). Zur Unterbindung von chymotryptischen Aktivitäten wurden dem Ansatz 10 µmol l<sup>-1</sup> TPCK (Sigma) zugesetzt. Die Kontrolle des tryptischen Verdaus erfolgte durch SDS-PAGE (siehe 2.14.1.).

#### 2.12. Arbeiten unter Stickstoff

Für die Disulfidbrückenanalytik wurde unter Schutzgas denaturiert und alkyliert. Alle Reaktionsgefäße wurden dazu 15 min in einem Vakuumexsikkator (Omnilab, BLB, Braunschweig) unter Wasserstrahlvakuum entgast, der anschließend mit Stickstoff befüllt wurde. Vor Gebrauch wurden alle Reaktionsgefäße abermals für 10 min mit Stickstoff durch Einblasen mit einer Pipette gespült. Sämtliche verwendete Lösungen wurden vor Gebrauch entgast und unter Stickstoffatmosphäre gesetzt. Dazu wurden die entsprechenden Lösungen ( bis 40 ml) in einen 100 ml Rundkolben (Omnilab) überführt und anschließend ein Wasserstrahlvakuum über 45 min angelegt. Danach wurde das Vakuum durch Eintragung von Stickstoff ausgeglichen. Größere Volumina von Lösungen wurden in einem Vakuumexsikkator für 1 h entgast und unter Stickstoffatmosphäre gesetzt.

#### *Reinigung des β-TP unter Schutzgasatmosphäre*

Die Reinigung des β-TP erfolgte prinzipiell wie unter 2.6. und 2.7.2. beschrieben. Für die Isolierung des Proteins unter Schutzgas waren folgende Modifizierungen notwendig: Nach der Trennung vom Überstand wurde das erhaltene Zellpellet für 10 min mit Stickstoff durch Einblasen des Gases mit einer Pipette gespült und anschließend der zuvor entgaste und stickstoffgesättigte Lysatpuffer, der mit 20 mM Iodacetamid supplementiert war, im Stickstoffgegenstrom zugegeben. Die Isolierung

der cytosolischen Fraktion (siehe 2.7.2.) erfolgte ebenfalls unter Stickstoffatmosphäre. Da schon auf der Stufe des Zellaufschlusses alkyliert wurde, erfolgte vor der Affinitätschromatographie ein Dialyseschritt unter Stickstoff. Die Affinitätschromatographie erfolgte mit zuvor entgasten und stickstoffgesättigten Puffern, wobei direkt nach der Chromatographie die proteinhaltige Lösung neutralisiert und durch 10-minütiges Einblasen von Stickstoff unter Schutzgasatmosphäre gesetzt wurde. Das so isolierte intrazelluläre  $\beta$ -TP wurde bis zu der Analytik bei -20 °C weggefroren.

### **2.13. Enzymatische Freisetzung und Isolierung von N-Glycanen**

Zur Abspaltung der N-Glycane wurden die zuvor durch RP-HPLC erhaltenen (siehe 2.14.3.) Glycopeptide gepoolt, im Speed Vac Concentrator (Savant Instruments, Inc., Hicksville, NY, USA) eingeeengt und in 450  $\mu$ l bidest. Wasser aufgenommen. Dann erfolgte die Zugabe von 50  $\mu$ l 10 x PNGase F Puffer. Der Ansatz wurde mit 5 U N-Glycosidase F (Roche, Basel, Schweiz) versetzt und über Nacht bei 37 °C im Wasserbad (mgw LAUDA, M3, Königshofen) inkubiert. Die Trennung der entstandenen N-Glycane von den de-N-glycosylierten Peptiden und den restlichen Peptiden erfolgte wiederum durch einen RP-HPLC-Schritt (siehe 2.14.3.).

#### *Verwendete Lösung:*

10 x PNGase F Puffer: 500 mmol l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fluka, Buchs, Schweiz), 0,2 % (w/v) NaN<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt), pH 7,5

### **2.14. Produktcharakterisierung**

#### **2.14.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE erfolgte in einem diskontinuierlichen Tris-HCl/Glycin-Puffersystem unter reduzierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli (1970).

#### *Probenvorbereitung:*

Proben aus Zellkulturüberständen wurden 1:2 mit 2 x Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 85 °C (Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg) denaturiert. Zur Analyse von

intrazellulären Proteinen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen der zu untersuchenden Kultur 5 min bei 800 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100  $\mu$ l Lysatpuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Probe für 1 min mit 50 W Ultraschall (3200 Branson, BLB, Braunschweig) homogenisiert. Kerne und Membranbruchstücke wurden durch 10 minütige Zentrifugation bei 3000 g abgetrennt (Biofuge pico, Heraeus, Osterode).

Alternativ erfolgte nach der Ultraschallbehandlung eine 1 stündige Inkubation mit jeweils 5  $\mu$ g  $\text{ml}^{-1}$  DNase I (Roche, Basel, Schweiz) und RNase A (Roche) bei 37 °C, an die sich eine Ethanol-fällung anschloß.

Zum Schluß wurden die Proben in 2 x Probenpuffer im Verhältnis 1:2 aufgenommen und ggf. bei -20 °C gelagert.

*Puffer:*

Lysatpuffer: 50  $\text{mmol l}^{-1}$  Tris-HCl (Sigma, St.Louis, MO, USA), 0,5 % (v/v) Triton X-100 (Sigma), 1  $\text{mmol l}^{-1}$  EDTA (Serva, Heidelberg), 50  $\mu\text{mol l}^{-1}$  Antipain (Bachem, Bubendorf, Schweiz), pH-Wert 7,5

2 x Probenpuffer: 128  $\text{mmol l}^{-1}$  Tris-HCl (Sigma), 10 % (w/v) SDS (Serva), 20 % (v/v) Glycerin (Merck, Darmstadt), 0,02 % (w/v), Bromphenolblau (Fluka, Buchs, Schweiz), pH 6,8  
nativ/reduzierend: +/- 20  $\text{mmol l}^{-1}$  DTT (Sigma)

*Durchführung:*

Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Biometra, Göttingen). Zur Trennung von Proteinen wurden 15 %-ige Acrylamidgele verwendet, die mit einem 3 %-igen Sammelgel überschichtet wurden. Zur optimalen Auftrennung der Proben wurde das Gel mit 2 verschiedenen Spannungsstufen gefahren: Die erste Stufe bei 75 V für 30 min (Focussierung) und die zweite Stufe bei 150 V für 60 min (Trennung). Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch Coomassie-Brilliantblau-Färbung.

*Folgende Lösungen und Apparaturen wurden verwendet:*

Vertikal-Elektrophorese (Biometra Minigel-Twin G42, Biometra, Göttingen)

Alle Lösungen wurden mit hochreinem Wasser (Milli-Q-Wasser-Filtrationsystem, Millipore, Eschborn) angesetzt.

SDS 10 % (w/v): 1 g SDS (Serva) ad 10 ml mit Milli-Q-Wasser

Sammelgelpuffer: 1 mol l<sup>-1</sup> Tris-HCl (Sigma) pH 6,8

Trenngelpuffer: 1,5 mol l<sup>-1</sup> Trisbase (Sigma) pH 8,8

Laufpuffer: 0,192 mol l<sup>-1</sup> Glycin (Merck), 250 mmol l<sup>-1</sup> Trisbase (Sigma), 0,1 % (w/v) SDS (Serva)

Sammelgel 3 %: 0,3 ml Rotiphorese Gel-30 (Acrylamid 30 % - Bisacrylamid 0,8 %, Roth, Karlsruhe), 0,375 ml Sammelgelpuffer, 2,27 ml Milli-Q-Wasser, 30 µl SDS, 5 µl TEMED (Serva), 15 µl APS (Serva)

Trenngel: 15 %: 4,5 ml Rotiphorese Gel-30 (Roth), 2,25 ml Trenngelpuffer, 2,10 ml Milli-Q-Wasser, 90 µl SDS, 4,5 µl TEMED (Serva), 13,5 µl APS (Serva)

Massenstandard: Prestained SDS-PAGE Standard, Low Range (Bio-Rad, München)

#### **2.14.1.1. Färbung der Gele**

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die Gele 30 min in Fixierlösung, bestehend aus 7 % (v/v) Eisessig (Serva) und 40 % (v/v) Methanol (J.T.Baker, Deventer, Niederlande) fixiert. Danach erfolgte die Färbung mit Brilliant Blue G-Colloidal Concentrate (Sigma) für 2 h. Entfärbt wurde anschließend in zwei Schritten. Zuerst wurden die gefärbten Gele eine Minute mit Entfärbelösung I (10 % (v/v) Eisessig (Serva), 25 % (v/v) Methanol (J.T.Baker) eine Minute entfärbt und anschließend bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes mit Entfärber II (25 % (v/v) Methanol (J.T.Baker) inkubiert.

#### **2.14.1.2. Autoradiographie von radioaktiv markierten Proteinen im Gel**

Zum Nachweis radioaktiv markierter Proteine wurden die Gele nach der elektrophoretischen Trennung in Fixierlösung (s.o.) fixiert und anschließend für 30 min in Amplify (NAMP 100, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) inkubiert. Die so präparierten Gele wurden auf dem Geltrockner (Modell 583, BioRad, München) getrocknet und auf einer Phosphor Imager-Platte exponiert. Nach 1 Tag erfolgte das Scannen der Platten im Phosphor Imager (Storm 860, Molecular Dynamics, Krefeld).

#### **2.14.2 *Semi-dry blotting* und Detektion der Proteine**

Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte nach der von Kyhse-Anderson (1984) entwickelten Methode des *semy-dry blotting* in einem Pharmacia Multiphor Transfersystem (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde auf Nitrocellulose- (Hybond<sup>TM</sup>-C-Nitrocellulose, Amersham Pharmacia) bzw. PVDF-Membranen (BioRad, München) geblottet. Dabei wurde die Nitrocellulosemembran für den immunchemischen Nachweis des , -TP verwendet, während die PVDF-Membranen aufgrund ihrer geringeren spezifischen Oberfläche und dadurch bedingten besseren Durchströmung der Membranen für Reagenzien der Edmannchemie für folgende N-terminale Sequenzierungen genutzt wurde.

Für den Blot wurden auf die Kathodenplatte neun in Kathodenlösung getränkte Filterpapiere gelegt und anschließend wurde das SDS-Gel blasenfrei auf das Filterpapier transferiert. Dann erfolgte das Auftragen der in Anodenlösung II getauchten Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membran. Darauf wurden drei in Anodenlösung II getränkte Filterpapiere und anschließend sechs in Anodenlösung I getränkte Filterpapiere gelegt. Dieses Sandwich wurde mit einer Rolle leicht angepreßt und die Anodenplatte darauf gelegt. Für 1 Stunde wurde bei 150 mA geblottet (30 V).

Die PVDF-Membranen wurden zur vollständigen Benetzung vor der Inkubation in Anodenlösung II für 30 Sekunden in Methanol (J.T.Baker, Deventer, Niederlande) hydrophilisiert.

*Verwendete Lösungen und Puffer:*

Kathodenlösung:	40 mmol l <sup>-1</sup> 6-Aminohexansäure (Merck, Darmstadt), 20 % (v/v) Methanol (J.T.Baker)
Anodenlösung I:	300 mmol l <sup>-1</sup> Trisbase (Sigma), 20 % (v/v) Methanol (J.T.Baker)
Anodenlösung II:	25 mmol l <sup>-1</sup> Trisbase (Sigma), 20 % (v/v) Methanol (J.T.Baker)

**2.14.2.1. Immunochemischer Nachweis des , -TP-Proteins auf Nitrocellulosemembranen**

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurden die Membranen nach dem Transfer für 30 min mit dem Blocker abgesättigt. Anschließend wurde der Blot mit primärer Antikörperlösung über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimal 10-minütigem Waschen mit TBS wurde der Blot mit peroxidasegekoppeltem sekundären Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur versetzt. Die Entwicklung erfolgte nach dreimaligem Waschen mit TBS durch Zugabe der Färbelösung. Nach erneutem mehrmaligen Waschen wurden die Blots getrocknet und gescannt.

*Verwendete Lösungen:*

Primärer Antikörper: Anti-, -TP-Serum aus Kaninchen (H.S.Conradt, GBF, Braunschweig)

Primäre Antikörperlösung: Primärer Antikörper in Blocker, Verdünnung 1:4000

Sekundärer Antikörper: Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antiserum (Dianova, Hamburg)

Sekundäre Antikörperlösung: Sekundärer Antikörper in TBS, Verdünnung: 1:400

Blocker: 2 % (w/v) BSA (Serva, Heidelberg), 10 % (w/v) Pferdeserum (Gibco BRL, Eggenstein), 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub> (Serva), ad TBS

TBS: 50 mmol l<sup>-1</sup> Trisbase (Sigma), 0,8 % (w/v) NaCl (Serva), 0,02 % (w/v) KCl (Serva) 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub> (Merck), pH 7,4

PBS: 150 mmol l<sup>-1</sup> NaCl (Serva), 8mmol l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fluka), 3 mmol l<sup>-1</sup> KCl (Fluka), 1,5 mmol l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fluka), 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub> (Merck), pH 7,4

Chlornaphtholstammlösung: 3 mg ml<sup>-1</sup> 3-Chlor-1-Naphthol (Sigma) in Ethanol (Merck)

Färbelösung: 5 ml Chlornaphthollösung, 25 ml PBS, 40 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck)

#### 2.14.2.2. Färbung von PVDF-Membranen mit Coomassie R-250

Das Färben dieser Membranen erfolgte nach der BioRad Arbeitsvorschrift „Sequi-blot PVDF Membrane for Protein Sequencing, Instruction Manual“. Hierfür wurden die Membranen nach dem Blotten dreimal mit Milli-Q-Wasser gewaschen und dann 5 Minuten mit PVDF CBB R-250 membrane stain, das sich aus 0,025 % (w/v) Coomassie<sup>R</sup> Blue R-250 gelöst in 40 % (v/v) Methanol (J.T.Baker, Deventer, Niederlande) zusammensetzt, gefärbt. Anschließend erfolgte die Entfärbung mit 50 % (v/v) Methanol. Nach dem Trocknen wurde die Membran bei -20 °C gelagert oder entsprechende Banden direkt für die Sequenzierung eingesetzt.

#### 2.14.3. Tryptisches *mapping* vor und nach PNGase-F-Verdau

Die Trennung der tryptischen Peptide vor bzw. nach PNGase F-Verdau (2.13.) erfolgte durch *reversed-phase* HPLC (SP 8800 System, Spectra Physics, San Jose, CA, USA) an einer Vydac-C<sub>18</sub>-Säule (4,6 x 250 mm, 5 µm Kieselgelpartikel, The Separations Group, Hesperia, CA, USA). Die Säule wurde mit Laufmittel A äquilibriert, und nach Injektion der Probe wurden die Peptide und N-Glycane unter Verwendung des unten angegebenen Gradienten bei einer Flußrate von 1 ml min<sup>-1</sup> eluiert. Das tryptische *Map* wurde bei 220 nm aufgenommen.

---

**Gradient RP-HPLC**

Laufmittel A: 0,1 % (v/v) TFA (HPLC-grade, Pierce, Rockford, IL, USA) in Wasser

Laufmittel B: 80 % (v/v) Acetonitril (J.T.Baker, Deventer, Niederlande), 0,1 % (v/v) TFA in Wasser

---

Zeit [min]	0	10	60	180
% Laufmittel B	0	0	20	50

---

**2.14.4. Proteinsequenzierung**

Die N-terminalen Sequenzen von Proteinen auf der PVDF-Membran (2.14.2.2) und von gereinigten Peptiden wurde durch automatisierten Edmannabbau in einem Applied Biosystem Modell 473 A Sequenziergerät (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) analysiert. Hierfür wurden 100-500 pmol Peptid auf Polybren (Foster City), einer polykationischen Matrix, aufgetragen, gewaschen und den zyklischen Abbaureaktionen unterworfen. Die entstandenen Phenylthiohydantoin-Derivate wurden im on-line Modus unter Benutzung der vom Hersteller gelieferten Software identifiziert.

**2.14.5. MALDI/TOF-MS**

Während für die MALDI (*matrix-assisted laser desorption ionisation*) die Peptide direkt mit der Matrix kokristallisiert wurden, erfolgte für die Analyse der N-Glycane zuvor eine Reduzierung und Permethylierung (Hakomori, 1964). Die Analyse der Proben wurde in einem Bruker REFLEX™ MALDI/TOF-MS Gerät (Bruker, Rheinstetten, Karlsruhe) durchgeführt. Dazu wurden etwa 1-10 pmol der Probe in Matrixlösung (10 mg ml<sup>-1</sup>) 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 10 % (v/v) Ethanol in bidest. Wasser) gelöst und auf dem *Target* eingetrocknet (Arbeitsvolumen 1 µl). Durch Beschuß mit dem Licht eines 337 nm-Stickstofflasers wurden die Molekülonen desorbiert. Die Masse der Ionen wurde nach Beschleunigung auf 20 kV durch Messung der Flugzeit TOF (*time-of-flight*) im linearen Modus oder nach Ablenkung im Reflectron durch einen *multi-channel-plate* Detektor ermittelt. Das Massenspektrum wurde nach Akkumulation von 20 Einzelmessungen mit Hilfe der vom Hersteller gelieferten Software erstellt.



#### 2.14.6. ESI-MS

Für die ESI-*(electro spray ionisation)* Untersuchungen von N-Glycanen und Peptiden wurde ein Finnigan MAT TSQ 700 Triple Quadrupol Massenspektrometer, das mit einer Finnigan Elektrospray-Quelle ausgestattet war (Finnigan MAT Corp., San Jose, CA, USA), eingesetzt. Die Proben wurden in Methanol mit 2 % (v/v) Ameisensäure aufgenommen und bei einer Flußrate von 2  $\mu\text{l min}^{-1}$  in die Elektrospray-Kammer injiziert. Die Beschleunigungsspannung betrug 4,5 kV.

Bei MS-MS-Analysen wurden nach dem CID-Modus (*collision induced dissociation*) die Ausgangsionen selektiv durch den ersten Analysator geleitet und dann in einer Kollisionszelle mit Argon (kin. Energie -35 eV) beschossen. Durch die entstandenen Fragmente wurde ein Masse-pro-Ladung-Spektrum erhalten, das dann mit der vom Hersteller gelieferten Software in ein Massenspektrum dekonvolutiert wurde.

#### 2.14.7. Analytische Trennung von Glycanen durch HPAEC-PAD

Das HPAEC-PAD System (*high pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection*, Hardy et al. 1988) ist zur Trennung von geladenen und neutralen Oligosacchariden geeignet und erlaubt auch die Trennung von Bindungsisomeren. Die gepulste amperometrische Detektion (PAD), die auf Redoxreaktionen der Kohlenhydrate an einer Gold- oder Platinelektrode beruht, erlaubt den Nachweis von Oligosacchariden im pmol-Bereich ohne Derivatisierung. Als HPLC-System diente ein Dionex BioLC System mit PAD (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Zur analytischen Trennung wurden 0,1 nmol neutrale, entsalzte (2.10.3) Oligosaccharide in 35  $\mu\text{l}$  bidest. Wasser gelöst und auf eine CarboPac PA1-Säule injiziert, die zuvor mit 0,1 N NaOH gespült worden war. Eluiert wurden die N-Glycane mit dem unten stehenden Gradienten bei einer Flußrate von 1  $\text{ml min}^{-1}$ . Die elektrochemische Detektion durch Messung der Redoxpotentiale an einer Goldelektrode erfolgte bei folgenden Detektorpotentialen und Pulsdauern: E1 = 50 mV, t1 = 480 ms; E2 = 500 mV, t2 = 120 ms; E3 = -500 mV, t3 = 60 ms).

---

**Gradient HPAEC-PAD**

Laufmittel A: 0,1 N NaOH (Serva)

Laufmittel B: 0,6 M NaOAc (Fluka) in 0,1 N NaOH (Serva)

---

Zeit [min]	0	40	45	50	55	60
% Laufmittel B	0	20	100	100	0	0

---

**2.15. Immuncytochemie****2.15.1. Immunfluoreszenzmikroskopie***Probenvorbereitung*

Aus Kulturflaschen wurden die Insektenzellen auf mit Poly-L-Lysin-beschichtete Coverslips (Durchmesser 15 mm, BLB, Braunschweig) ausgesät und nach 1 Tag Inkubation bei 27 °C infiziert. Alternativ wurden Zellen aus Suspensionskulturen 2 h vor der Zellpräparation auf die beschichteten Coverslips für 2 h gegeben, um sie adhären zu lassen.

*Zellpräparation*

Fixierung und Permeabilisierung erfolgte in 6-Lochplatten (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA). Alle Lösungen wurden in PBS angesetzt und mit 4,5 g l<sup>-1</sup> NaCl (Serva) auf 420 mOsmol kg<sup>-1</sup> korrigiert, um ein Dehnen und *blebbing* der Zellen zu verhindern. Die Zellen wurden in 3,7 % (v/v) Formaldehyd in PBS für 10 min fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Um vorhandene, die Färbung störende, freie Aldehydgruppen abzusättigen, erfolgte eine fünfminütige Inkubation einer Glycin-Lösung. Die Zellen wurden dann für 5 min mit 0,1 % (v/v)-iger Triton X-100 Lösung (Sigma, St. Louis, MO, USA) permeabilisiert und abschließend dreimal mit PBS gewaschen.

*Verwendete Lösungen:*

Formaldehydstammlösung: Eine 10 % (w/v)-ige Formaldehydlösung in PBS wurde aus Paraformaldehyd (Fluka, Buchs, Schweiz) durch Depolymerisation in Lösung

hergestellt. Dazu wurden 3,7 g Paraformaldehyd in 65 ml Milli-Q-Wasser (Milli-Q-Wasser-Filtrationssystem, Millipore, Eschborn suspendiert und auf 60 °C unter ständigem erwärmt. Dann erfolgte die Zugabe von einigen Tropfen 2 N NaOH (Serva, Heidelberg) bis die Depolymerisation einsetzte. Dann wurden 10 ml 10 x PBS supplementiert und, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und mit Milli-Q-Wasser ad 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

10 x PBS:	1500 mmol l <sup>-1</sup> NaCl (Serva, Heidelberg), 80 mmol l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fluka, Buchs, Schweiz), 30 mmol l <sup>-1</sup> KCl (Fluka) 15 mmol l <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fluka), 0,2 % (w/v) NaN <sub>3</sub> (Merck, Darmstadt) pH 7,4
PBS:	150 mmol l <sup>-1</sup> NaCl (Serva, Heidelberg), 8 mmol l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fluka, Buchs, Schweiz), 3 mmol l <sup>-1</sup> KCl (Fluka) 1,5 mmol l <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fluka), 0,02 % (w/v) NaN <sub>3</sub> (Merck, Darmstadt) pH 7,4
Fixierungslösung:	3,7 % (v/v) Formaldehydstammlösung in PBS
Glycin-Lösung:	0,1 mol l <sup>-1</sup> Glycin (Sigma) in PBS
Permeabilisierungslösung:	0,1 % (v/v) Triton X-100 (Sigma) in PBS

#### 2.15.1.1. Immunomarkierung des , -TP

Der Nachweis des rekombinanten , -TP erfolgte durch indirekte Markierung mit polyklonalem Antiserum aus Kaninchen (H.S.Conradt, GBF, Braunschweig) als Primärantikörper. Alle Arbeitsschritte wurden auf Parafilm (American National Can, Chicago, IL, USA) in einer feuchten Petrischale (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA) durchgeführt.

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Coverslips nach der Permeabilisierung der Zellen 1 Stunde mit Blocker inkubiert. Dann erfolgte die Primärmarkierung mit dem ersten Antikörper in Blocker (1:150) für 1 h an. Es folgte ein Waschschriff mit PBS, an den sich eine einstündige Inkubation des sekundären Antikörpers mit einer Verdünnung von 1:150 in Blocker anschloß. Nach

anschließendem Waschen mit PBS wurden die Coverslips getrocknet, in Mowiol/Dabco-Lösung eingebettet und nach Aushärtung mit Nagellack versiegelt. Konfocale Bilder wurden mit dem Mikroskop BioRad MRC 1024 (BioRad, München) und der dazugehörigen Darstellungssoftware LaserSharp aufgenommen.

*Verwendete Lösungen:*

Primäre Antikörperlösung:	, -TP-Antiserum aus Kaninchen (H.S.Conradt, GBF, Braunschweig), Verdünnung: 1 : 150 in Blocker
Sekundäre Antikörperlösung:	FITC-Ziege-anti-Maus, affinitätsgereinigt (Dianova, Hamburg), Verdünnung: 1 : 150 in Blocker
Blocker:	1 % (w/v) BSA (Sigma), 1 % (v/v) Ziegenserum (Dianova) in PBS
Mowiol/Dabco-Lösung:	4,76 ml Glycerin (Serva), 2,4 g Mowiol 4-88 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), 6 ml Milli-Q-Wasser, 12 ml 0,2 mol l <sup>-1</sup> Tris-HCl (pH = 8,5), 3 g Dabco (Fluka)

#### **2.15.1.2. Diamino-2-phenylindol (DAPI)-Färbung**

Die Färbung der Kerne erfolgte nach der Fixierung und Permeabilisierung zusammen mit der Immunofärbung durch Zugabe von 0,1 µg ml<sup>-1</sup> DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) zur sekundären Antikörperlösung.

#### **2.15.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

*Zellpräparation*

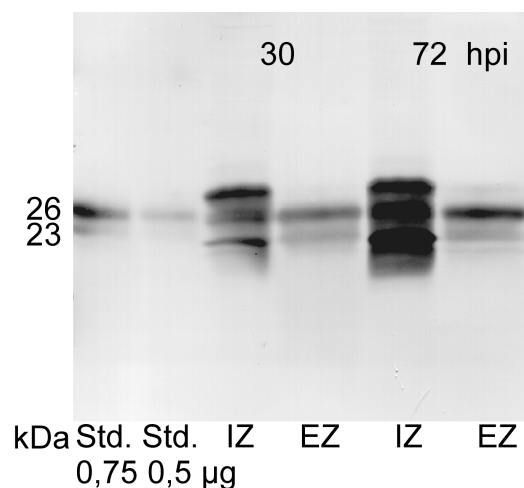
Die Zellen ( $2 \times 10^6$ ) wurden in 1 % Formaldehydlösung (hergestellt aus der Stammlösung, siehe 2.15.1) mit 0,2 % Glutaraldehyd (Serva, Heidelberg) für 1 h auf Eis fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,01 mol l<sup>-1</sup> Glycin in PBS wurden die Proben mit einer aufsteigenden EtOH-Reihe (J.T.Baker, Deventer, Niederlande) entwässert: 10, 30 % auf Eis. 50 % bei -20 °C, 70, 90 100 % bei -35 °C. Die Proben wurden dann in mehreren Schritten bei -35 °C in Lowicryl K4M-Harz (Plano, Wetzlar)

überführt: 1 Teil Ethanol + 1 Teil K4M, 1 Teil Ethanol + 2 Teile K4M und reines K4M. Das reine K4M wurde mehrfach gewechselt und dann im UV-Licht bei -35 °C polymerisiert. Es schloß sich eine weitere Polymerisation mit UV-Licht für 1 Tag bei Raumtemperatur an. Nach dem Trimmen (Herstellung von trapez-förmigen Aschnittflächen) wurden die Proben erneut unter UV-Licht gestellt und danach Ultradünnschnitte mit Hilfe von Glasmessern (Plano) hergestellt. Diese wurden auf Formvar-bedeckte 300er Nickelgrids (Plano) aufgezogen. Die mit den Ultradünnschnitten gekoppelten Nickelgrids wurden mit einem Tropfen mit dem , -TP-Antiserum (1:150, H.S.Conradt, GBF, Braunschweig) übernacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem intensiven Waschschrift mit PBS erfolgte die Kopplung der gebundenen Antikörper an Protein A-Gold Partikel (10 nm oder 15 nm Durchmesser (British Biocell, Cardiff, GB). Danach wurden die Grids in PBS und in Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Abschließend erfolgte eine Nachkontrastierung mit 4 % (w/v)-iger Uranylacetatlösung (pH 4,0) (Serva). Die Beobachtung wurde an einem Zeiss EM 910 Transmissionselektronenmikroskop (Plano) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV durchgeführt.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Akkumulation des Modellproteins $\beta$ -Trace Protein ( $\beta$ -TP) in Insektenzellen

Zur einführenden Charakterisierung der Produktakkumulation rekombinanter sekretorischer Proteine in Baculovirus-infizierten Insektenzellen wurde das Modellprotein  $\beta$ -Trace Protein ( $\beta$ -TP) wie unter 2.4.3. beschrieben bei einer MOI von 3 exprimiert. Nach 30 und 72 h erfolgten Probenahmen, die durch SDS-PAGE/*western blotting* analysiert wurden. Um die Veränderungen bzw. weniger stark konzentrierten intrazellulären Proteinformen des  $\beta$ -TP zu detektieren, wurde beim Auftrag der Proben ein Verhältnis der intrazellulären zu den extrazellulären Proben von 5:1 gewählt (Abb.8).



**Abb.8.** Expression des  $\beta$ -TP in Baculovirus-infizierten High Five Zellen. Nach 30 und 72 h post Infektion wurden  $1 \times 10^6$  Zellen aufgearbeitet und 10 % des Ansatzes auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der Überstand wurde 1:2 mit Probenpuffer versetzt und 2 % auf das Gel aufgetragen. Insgesamt ergab sich dadurch ein Verhältnis der intrazellulären Fraktionen (IZ) zu den extrazellulären Fraktionen (EZ) von 5:1. IZ, intrazellulär; EZ, extrazellulär; Std., Standard  $\beta$ -TP aus High Five Zellen.

Die Quantifizierung der Mengen des  $\beta$ -TP erfolgte durch Abschätzung anhand der aufgetragenen Standards. Die Menge des konstitutiv sekretierten  $\beta$ -TP nach 72 h beträgt demnach etwa  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  und liegt damit in einem für Proteinexpressionen mit dem Baculovirus Expressionssystem zu diesem Infektionszeitpunkt üblichen Bereich für das  $\beta$ -TP (Chico und Jäger, 2000). Wie aus dem Western Blot weiter hervorgeht, verbleiben aber beträchtliche Anteile des synthetisierten  $\beta$ -TP in den Zellen und werden nicht sekretiert. So sind zu beiden Zeitpunkten der Probenahme jeweils etwa 50 % des gebildeten Modellproteins stabil mit den Zellen assoziiert. Der prozentuale Anteil des intrazellulär akkumulierten  $\beta$ -TP liegt in dem Bereich, der im allgemeinen bei der Expression verschiedener rekombinanter Proteine in infizierten Insektenzellen

detektiert wird (siehe 1.5. Herstellung rekombinanter Proteine mit dem Baculovirus-Expressionssystem). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch nach Expression des  $\beta$ -TP in infizierten Sf21 Zellen erzielt (nicht gezeigt). Das  $\beta$ -TP eignet sich somit hervorragend zur detaillierten Untersuchung der biologischen und molekularen Ursachen der Akkumulation rekombinanter sekretorischer Proteine während der Expression in infizierten Insektenzellen.

### **3.2. Immunolokalisierung des intrazellulären $\beta$ -TP in Insektenzellen**

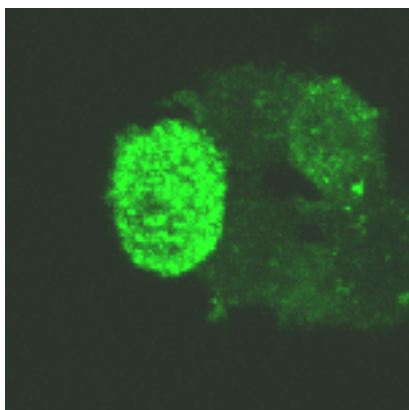
Um das Phänomen der intrazellulären Akkumulation rekombinanter sekretorischer Proteine näher zu charakterisieren, erfolgte zunächst die immunhistochemische Lokalisierung des intrazellulären Proteins in infizierten Zellen durch Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie. Dabei war von besonderem Interesse, ob sich der Akkumulationsvorgang mit den cytopathologischen Veränderungen, hervorgerufen durch die Baculovirusinfektion, korrelieren läßt.

#### **3.2.1. Immunolokalisierung des intrazellulären $\beta$ -TP durch Immunfluoreszenz**

Für die Etablierung der Immunmarkierung durch Immunfluoreszenz wurden High-Five-Zellen aus Suspensionskulturen mit dem AcMNPV- $\beta$ -TP mit einer MOI=3 infiziert, nach 24 h entnommen und auf Coverslips gegeben. Nach zwei Stunden Inkubation bei 27°C erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung. Als Fixantien und Permeabilisierungs-Reagentien wurden jeweils verschiedene Konzentrationen an Formaldehyd, Formaldehyd/Glutaraldehyd, Aceton, Aceton/Methanol, Ethanol, Methanol, Saponin und Triton X-100 getestet, wobei die Immersionsfixation mit 3,7 % (v/v) Formaldehyd die besten Ergebnisse lieferte. Während dieses Schrittes kam es zu durch das Fixans hervorgerufenen supravitalen Veränderungen innerhalb der Zellen, so daß eine massive Exocytose zu beobachten war. Die Konservierung der Strukturen innerhalb der Zellen bzw. die Unterbindung der Exocytose konnte durch Korrigieren der Osmolarität der verwendeten Puffer mit NaCl auf 420 mOsmol kg<sup>-1</sup>, also auf den für die Kultivierung der Insektenzellen mit dem Medium TEX entsprechenden Wert (siehe

2.2.1.), erreicht werden.

Wenn die freien Aldehydgruppen nach der Fixierung sofort mit 0,1 mol l<sup>-1</sup> Glycin abgesättigt wurden, verbesserten sich die Färbungen mit Antikörpern deutlich. Dabei wurden die besten Permeabilisierungsergebnisse mit der kontrollierten Permeabilisierung durch Triton X-100 erreicht. Alle Proben aus Suspensionskulturen wurden im weiteren Verlauf der Arbeit nach diesem Schema und wie im Methodenteil unter 2.15.1. beschrieben bearbeitet. Exemplarisch ist in Abb.9 eine  $\beta$ -TP Färbung von infizierten High Five Zellen aus Suspensionskulturen nach 24 h im Epifluoreszenzmikroskop dargestellt.



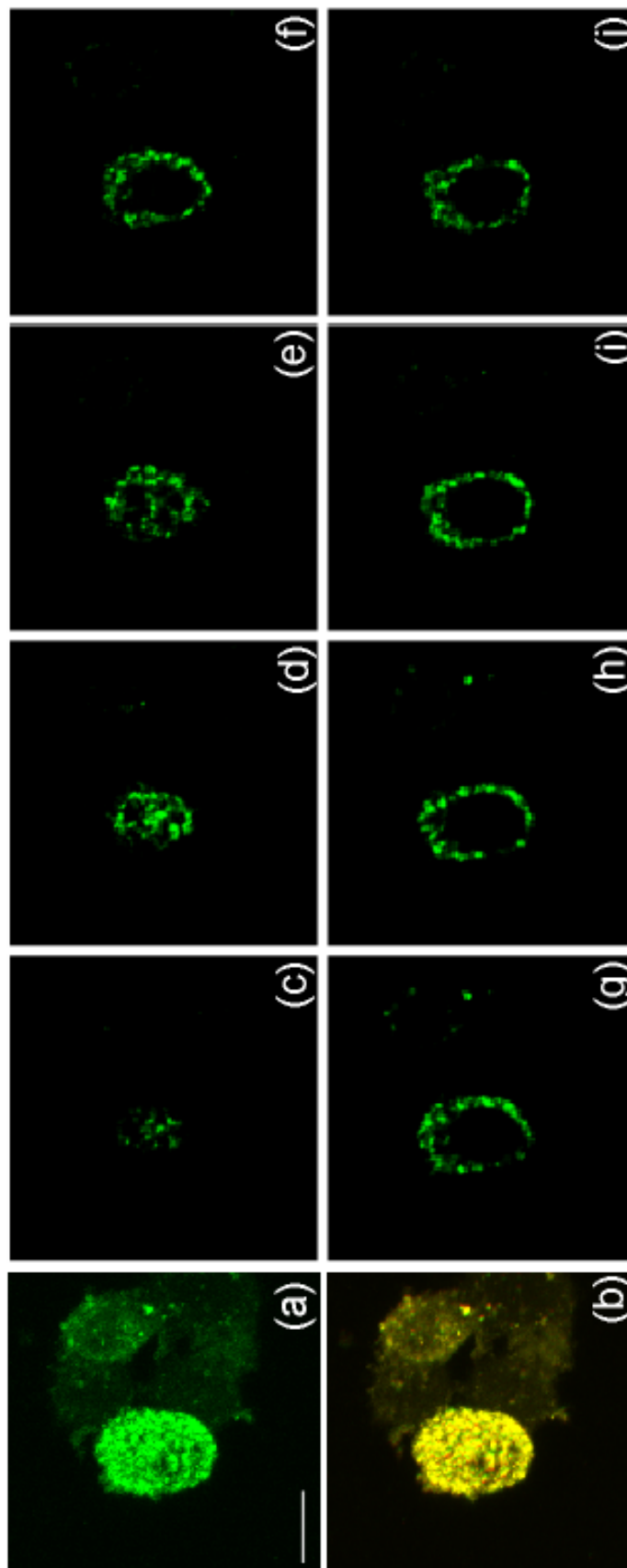
**Abb.9.** Immunolokalisierung des intrazellulären  $\beta$ -TP in infizierten High Five Zellen aus Suspensionskulturen 24 hpi. durch Epifluoreszenzmikroskopie.

Aus der Färbung geht deutlich hervor, daß das rekombinante  $\beta$ -TP ubiquitär über die gesamte Zelle verteilt ist. Nicht zu erkennen sind dabei distinkte zelluläre Strukturen. Selbst die Kerne, die nach Baculovirusinfektion den größten Raum in den Zellen einnehmen und dadurch leicht zu identifizieren sein müßten, können vom Cytoplasma nicht differenziert werden. Der Grund hierfür liegt in der Mikroskopiertechnik an sich. In der dargestellten Abbildung müssen Strukturen visualisiert werden, die in der Zelle dreidimensional organisiert sind und die von anderen Zellstrukturen teilweise überlappt werden. Fokussiert man mit einem Epifluoreszenzmikroskop eine Ebene innerhalb der Zelle wird das Abbild dieser Ebene durch das unscharfe Abbild der ober- und unterhalb der fokussierten Ebene liegenden Strukturen überdeckt. Dabei wird der Kontrast so gering, daß feine Strukturen im Epifluoreszenzmikroskop nicht mehr erkennbar sind.



Bei der konfokalen Mikroskopie wird diese *out-of-focus*-Region durch zwei Blenden im Strahlengang weitestgehend entfernt. Man kann innerhalb einer Zelle so eine etwa 0,5 bis 1,5  $\mu\text{m}$  dicke Schicht darstellen, ohne daß das Bild durch die *out-of-focus*-Region unscharf wird. Des weiteren ist es möglich, über Darstellung von Schnittserien, Erzeugung dreidimensionaler Bilder und Vertikalschnitte wertvolle Informationen über den räumlichen Aufbau der Zelle zu erhalten. Abb.10a zeigt das gleiche Präparat, das aber im Gegensatz zu Abb.9 mit der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie visualisiert wurde. Während durch das Ausblenden der *out-of-focus*-Region keine wesentlichen Verbesserungen erreicht werden, sind durch die Darstellung des dreidimensionalen Bildes (10b) sowie durch die Schnittserie (10c-j) einige wesentliche Aussagen möglich. Unter Zuhilfenahme einer Rot/Grün-Brille kann man in Abb.10b deutlich erkennen, daß die Zelle über den gesamten Raum dreidimensional mit einer kugelförmigen bzw. ellipsoiden Form organisiert ist. Durch die Infektion kommt es in der zweiten Phase der Infektion durch das Umschalten auf die ODV-Phase zu einigen massiven cytologischen Veränderungen innerhalb Zelle (siehe 1.3.), was sich morphologisch im Lichtmikroskop in einer dramatischen Vergrößerung des Zellkerns bemerkbar macht. Wie aus den Abb.10b-f hervorgeht ist in diesem Raum kein rekombinantes Protein lokalisiert. Vielmehr ist es über den gesamten cytoplasmatischen Raum der Zelle verteilt, der durch die Hypertrophie des Zellkerns in den Einzelschnitten als schmale Ringzone zwischen Kernmembran und Plasmamembran zu erkennen ist. Unter der Voraussetzung, daß durch Triton X-100 alle Kompartimente und Vesikel der Zellen permeabilisierbar sind, läßt sich weiter feststellen, daß das  $\beta$ -TP innerhalb des Cytoplasmas in vesikulären Strukturen lokalisiert ist.

Ein generelles Problem stellt die Aufnahme von Kinetiken der rekombinanten Produktbildung dar. Eine Grundvoraussetzung für die Durchführung solcher Experimente ist, daß die Zellen einer Suspensionkultur fest an einen beschichteten Träger (Coverslip) fixiert werden können, so daß sie auch während der Probenvorbereitung durch die einzelnen Markierungs- und Waschschriffe nicht

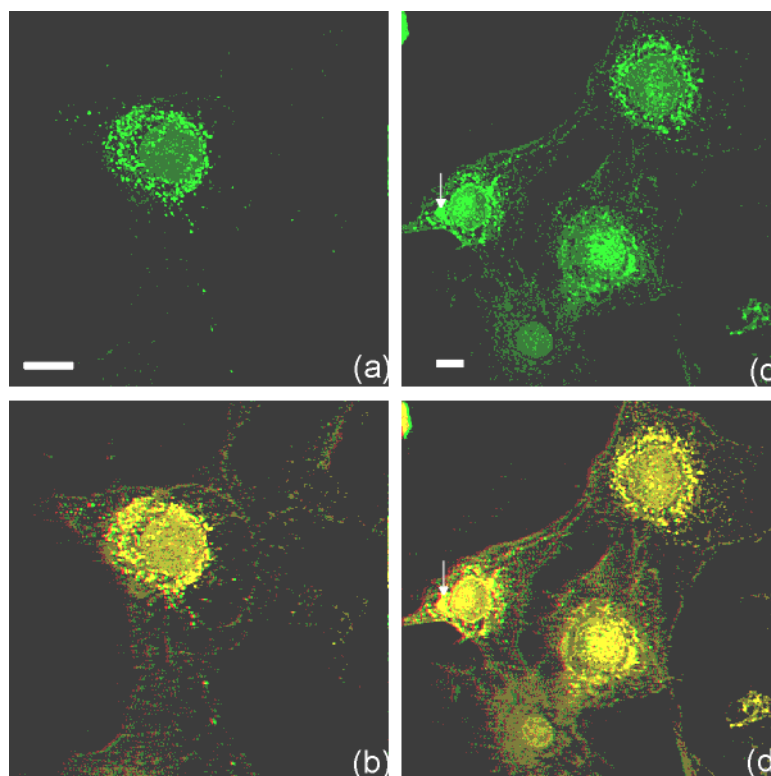


**Abb. 10.** Immunolokalisierung des intrazellulären  $\beta$ -TP in infizierten High Five Zellen aus Suspensionskulturen 24 hpi. durch Laser Scanning Mikroskopie. (a) Summation aller Einzelschnitte. Der Balken entspricht 20  $\mu$ m. (b) Dreidimensionales Bild aus allen Einzelschnitten mit dem Confocal Assistant errechnet. Die Winkel bei der dreidimensionalen Rot/Grün-Abbildung betragen 0° und 10°. Zur Steigerung des dreidimensionalen Eindrucks ist die z-Achse um den Faktor 5 gestreckt. (c-j) Schnittserie des Präparates. Die Serie verläuft horizontal von links nach rechts, wobei sich die Schnitte entlang der z-Achse von oben nach unten bewegen.

abgelöst werden. Generell ist das für nicht infizierte Kulturen völlig unproblematisch. Wie sich aber zeigte, sind mit zunehmender Infektionszeit nur sehr wenig infizierte Zellen an den Träger gebunden, und von diesen wird während der Markierung auch noch die Majorität von der Oberfläche abgelöst. Die Ursache dafür liegt in der Baculovirusinfektion *per se*, da diese die Umordnung des Cytoskellets induziert (Volkmann und Zahl 1990, Roncarati und Knebel-Mörsdorf 1997), wobei die Zellen die Fähigkeit verlieren, sich an Oberflächen zu binden. Alternativ erschien es deshalb sinnvoll, die Zellen vor der Infektion auf beschichteten Oberflächen zu kultivieren und dann zu infizieren. Ohne vorhergehende Beschichtung stellt auch hier das Ablösen der Zellen nach Baculovirusinfektion das größte Problem dar. Die Zellen beginnen sich durch die virusinduzierte Umordnung des Cytoskellets schon nach wenigen Stunden abzurunden, um dann im weiteren Verlauf der Infektion vollkommen die Fähigkeit der Adhärenz zu verlieren, so daß sich die Zellen nach 2 Tagen fast quantitativ im Überstand befinden. Um das Zeitfenster dieses Prozesses zu erweitern, erschien es sinnvoll, die Zellen durch die Kultivierung auf vorbeschichteten Oberflächen physikalisch fester zu binden, so daß sich auch abgerundete Zellen noch mikroskopieren lassen. Dazu wurden Kulturflaschen und Coverslips mit Poly-L-Lysin, Laminin oder Kollagen beschichtet. Während dabei die Zellen auf Laminin überhaupt nicht adhären, wachsen sie auf Kollagen, breiten sich aber nicht aus. Zufriedenstellende Ergebnisse brachte dagegen die Beschichtung mit Poly-L-Lysin, mit der es zumindest möglich war, Zellen bis 38 Stunden nach der Infektion zu mikroskopieren.

Für die Immunolokalisierung des  $\beta$ -TP in adhärenenten Kulturen wurden beschichtete Glascoverslips in 6-Lochplatten transferiert. Aus einer Kulturflasche erfolgte dann die Inokulation mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen, an die sich nach einem Tag die Infektion bei einer MOI=3 anschloß. Die Spezifität der Markierungen wurde durch Kontrollfärbungen mit nicht infizierten Zellen, dem sekundären Antikörper alleine und einem nicht bindenden primären Antikörper überprüft. In der vorliegenden Arbeit diente ein polyklonaler Antikörper (Kaninchen) gegen das gliale fibrilläre saure Protein aus

Säugerneuronen als primärer Kontrollantikörper. Alle Kontrollen wiesen keine spezifischen Färbungen auf (nicht gezeigt). Zwei repräsentative, für  $\beta$ -TP typische Färbungen sind in Abb.11 für die jeweiligen Infektionszeitpunkte dargestellt, wobei die Probe bei 38 h p.i. den letztmöglichen Zeitpunkt der Probennahme kennzeichnet, bevor sich die Zellen von der Oberfläche ablösen bzw. abreißen.



**Abb.11.** Immunolokalisierung des intrazellulären  $\beta$ -TP in infizierten, adhärenen High Five Zellen 24 hpi. (a, b) und 38 hpi. (c, d) durch Laser Scanning Mikroskopie. (a) und (c) Summation aller Einzelschnitte. (b) und (d) Dreidimensionales Bild, das aus allen Einzelschnitten mit dem Confocal Assistant errechnet wurde. Die Winkel bei der dreidimensionalen Rot/Grün-Abbildung betragen  $0^\circ$  und  $10^\circ$ . Zur Steigerung des dreidimensionalen Eindrucks ist die z-Achse um den Faktor 5 gestreckt. Die Balken entsprechen jeweils  $10\ \mu\text{m}$ . Die Pfeile kennzeichnen eine mögliche Akkumulation des  $\beta$ -TP.

Deutlich ist zu erkennen, daß sich die Qualität der Präparate durch die Verwendung von adhärenen Kulturen verbessert hat. Dadurch, daß adhärenente Kulturen vorwiegend eine zweidimensionale Architektur aufweisen, die lediglich in Kernnähe in drei Dimensionen ausgerichtet ist, lassen sich die Strukturen sehr gut auflösen. Intrazellulär ist das rekombinante Protein beider Präparationen in vielen kleinen Vesikeln lokalisiert, was in Einklang mit den Ergebnissen in High Five Zellen aus den Suspensionskulturen steht (Abb.10). Der diffus gefärbte Bereich in der Mitte der Zellen ist nicht durch enthaltenes  $\beta$ -TP markiert, sondern kennzeichnet, wie durch Negativstain gezeigt werden konnte, geringe unspezifische Reaktionen. Des weiteren scheinen sich mit

fortschreitender Infektion die Vesikel zu vergrößern wie durch den Pfeil in Abb. 11c angedeutet. Detailliertere Aussagen sind aufgrund der oben beschriebenen begrenzten Anwendbarkeit der Immunfluoreszenzmikroskopie, vor allem durch die oben diskutierten Probleme bei der Probenvorbereitung nicht möglich.

### **Zusammenfassung**

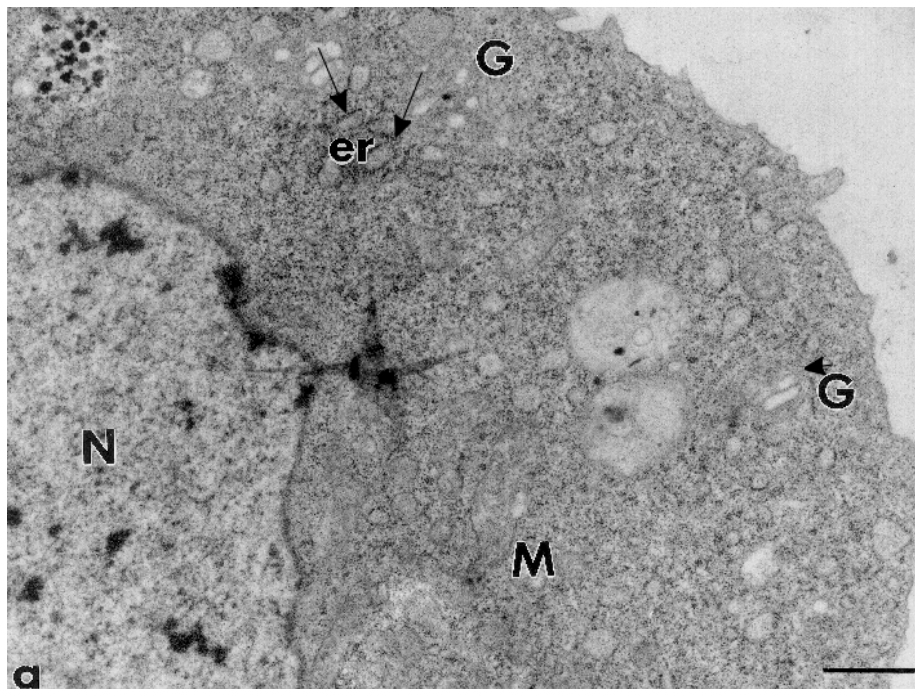
Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, daß das rekombinante  $\beta$ -TP im cytoplasmatischen Raum der Zellen in vielen vesikulären Strukturen lokalisiert ist, wobei diese mit zunehmender Infektionszeit partiell vergrößert erscheinen. Für die Aufnahme von Produktbildungskinetiken ist die Immunfluoreszenz nicht geeignet, da durch die Virusinfektion in der ODV-Phase die Umordnung des Cytoskeletts induziert wird. Durch diese Umordnung ist es nicht mehr möglich, die zu mikroskopierenden Zellen quantitativ an entsprechende Träger zu binden, wodurch keine repräsentativen Untersuchungsergebnisse möglich sind.

#### **3.2.2. Elektronenmikroskopische Charakterisierung nicht infizierter und infizierter Insektenzellen und Immunlokalisierung des intrazellulären $\beta$ -TP**

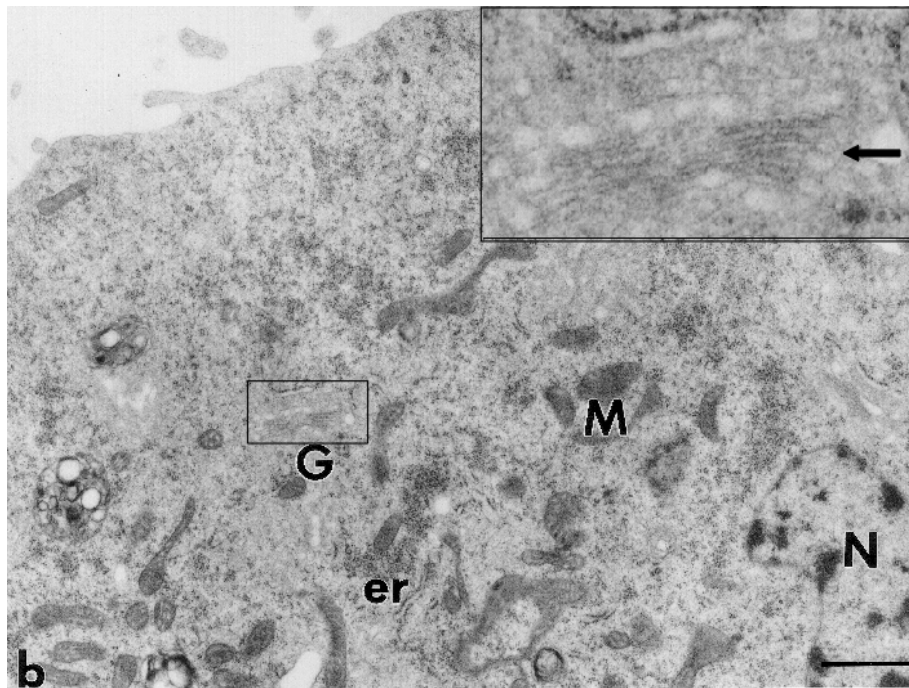
Aufgrund des um Größenordnungen höheren Auflösungsvermögens (bis zu 0,1 nm) bietet die Elektronenmikroskopie besondere Vorteile, die eine detaillierte ultrastrukturelle Beobachtung der Baculovirusinfektion in Insektenzellen und der Kompartimentierung sowohl von nicht infizierten als auch von infizierten Insektenzellen zuläßt. Des weiteren sind auch Aufnahmen von Produktbildungskinetiken rekombinanter Proteine aus diesem Expressionssystem möglich, da bei der TEM die Proben nicht auf einem Träger fixiert werden müssen und so das Hauptproblem bei der Immunfluoreszenzmikroskopie von infizierten Insektenzellen umgangen werden kann. Für die Aufnahme von Kinetiken der Produktbildung des  $\beta$ -TP in infizierten Sf21 und High Five Zellen wurden die Zellen einer 100 ml Suspensionskultur (Zellkonzen-

tration:  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) bei einer  $\text{MOI}=3$  mit dem AcMNPV- $\beta$ -TP infiziert. Nach 0, 20, 44 und 68 h erfolgten die Probenahmen, die wie unter 2.15.2. beschrieben präpariert wurden. Mikroskopiert wurden jeweils eine Serie von ca. 10 Einzelschnitten, so daß die im folgendem gezeigten Abbildungen repräsentative Querschnitte der zellulären Strukturen zu den jeweiligen Zeitpunkten der Infektion darstellen.

Die Abbildungen 12a und b zeigen repräsentative Schnitte der beiden verwendeten Insektenzellen vor der Infektion. In beiden Zellen sind die Transportkompartimente des Sekretionsweges, das rauhe endoplasmatische Reticulum (ER) und der Golgi-Apparat, eindeutig identifizierbar. Das ER ist dabei nicht in einer netzwerkartigen Form organisiert. Vielmehr sieht man sehr viele an Vesikel gebundene Ribosomen. Die Golgi-Apparate bestehen wie bei einer normalen eukaryotischen Zelle aus einer Ansammlung flacher membranumhüllter Zisternen, den sogenannten Golgi-Stapeln. In Abb 12b ist dieser Golgi-Stapel in High Five Zellen besonders gut sichtbar.



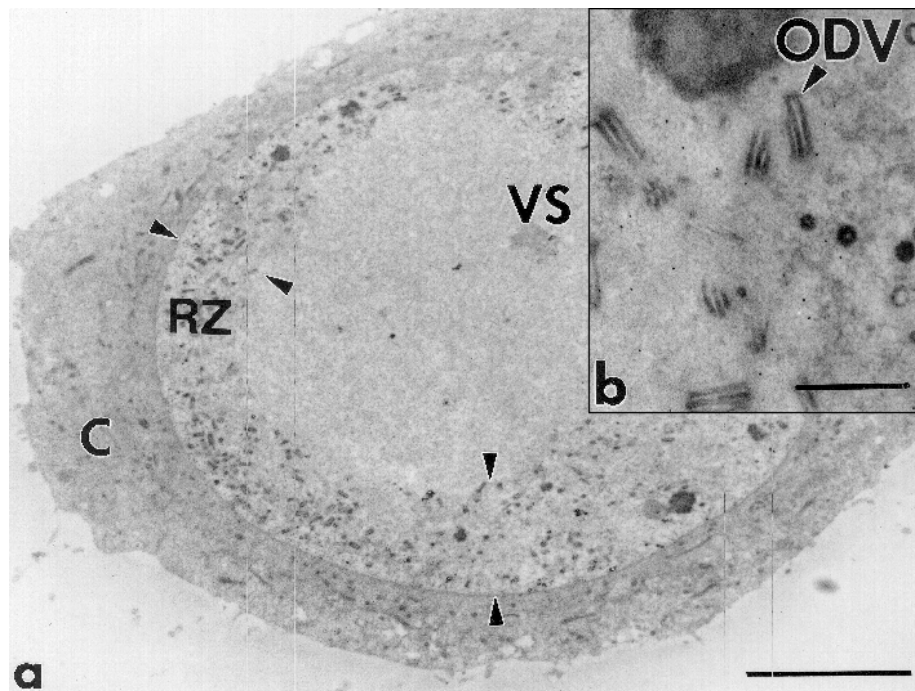
**Abb.12a.** Repräsentativer Ausschnitt einer nicht infizierten Sf21 Zelle durch TEM. N, Nucleus; M, Mitochondrium; G, Golgi-Apparat; er, Endoplasmatisches Reticulum. Der Balken auf der Abbildung entspricht einer Länge von  $1 \mu\text{m}$ .



**Abb. 12b.** Repräsentativer Ausschnitt einer nicht infizierten High Five Zelle durch TEM. In dem Fenster ist ein Golgi-Apparat mit den einzelnen Stapeln (Pfeil) vergrößert abgebildet. N, Nucleus; M, Mitochondrium; G, Golgi-Apparat; er, Endoplasmatisches Reticulum. Der Balken auf der Abbildung entspricht einer Länge von 1  $\mu\text{m}$ .

Für die Untersuchungen der Produktakkumulation rekombinanter Proteine in infizierten Insektenzellen ist die erste Phase, die BV-Phase (bis ca. 20 h), nicht relevant, da die unter dem Polyhedrin-Promotor stehenden Gene zu diesem Zeitpunkt kaum exprimiert werden. Aus diesem Grund erfolgten die Probenahmen erst ab 20 hpi, einem Zeitpunkt, der durch den Übergang von der BV- zur ODV-Phase charakterisiert ist. Durch die Baculovirusinfektion werden einige dramatische cytologische Veränderungen der Zelle induziert. So sind 20 h nach der Infektion die späten Ereignisse der Baculovirusinfektion in High Five Zellen nach Umschalten auf die ODV-Phase deutlich erkennbar (Abb.13a). Das Virogene Stroma ist schon in seine reife Struktur kondensiert, die in eine als *chromatic mass* bezeichnete elektronendichte, gitterartige Struktur und in einen intrastromalen granulären elektronendurchlässigen Raum unterteilt wird (Harrap, 1972, Young et al., 1993). Neben dieser charakteristischen Struktur entwickelt sich das distinkte peristromale Kompartiment des Nukleoplasmas, die Ringzone (Benz, 1986). In diesem Kompartiment erfolgt die für die Umhüllung der

Capside nötige *de novo* Membransynthese und das Assembly und Einhüllen der verpackten Capside. Die mit einer Membran umhüllten ODV-Viren akkumulieren in dieser Zone (Abb.13b) und werden erst nach Lyse der Zelle abgegeben.

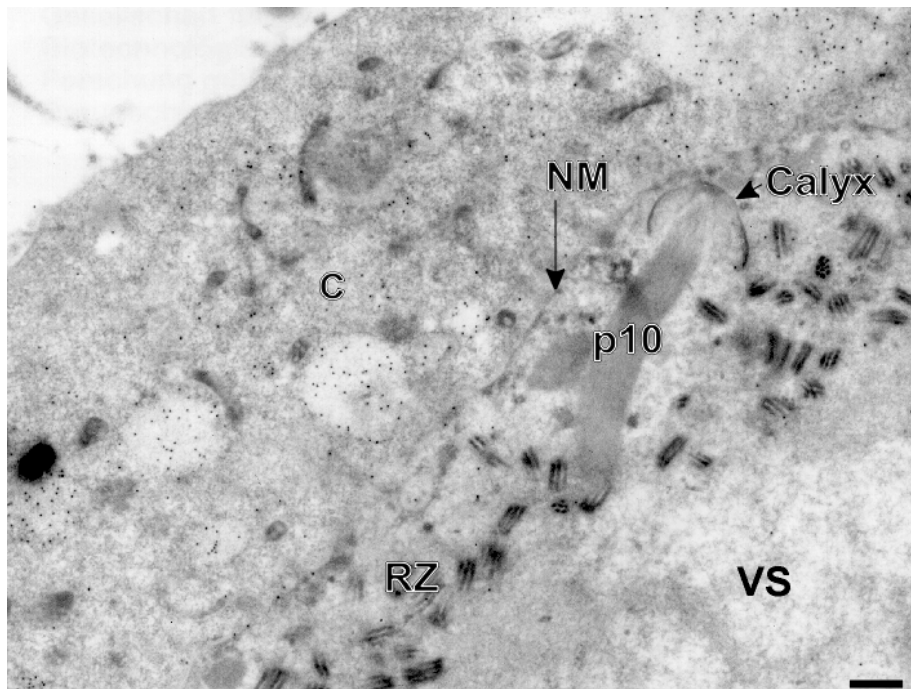


**Abb.13.** AcMNPV- $\beta$ -TP-infizierte High Five Zellen nach 20 h. Die Zelle befindet sich in der Übergangsphase zwischen BV- und Polyhedra-Phase. (a) Querschnitt einer High Five Zelle. (b) Ausschnitt aus der Ringzone aus (a) mit den sich akkumulierenden ODVs. RZ, Ringzone; VS, Virogenes Stroma; C, Cytoplasma; ODV, occluded derived virus. Die Balken auf den Abbildungen entsprechen (a) 5  $\mu$ m und (b) 0,5  $\mu$ m.

Bei Wildtyp-Viren akkumuliert zusätzlich das Hüllprotein Polyhedrin in dieser Zone und schließt verschiedene zuvor umhüllte Virionen in seine kristalline Matrix ein. Aufgrund des Austausches des Polyhedringens gegen das  $\beta$ -TP-Gen ist natürlich diese kristalline Matrix nicht sichtbar. Im weiteren Verlauf der Infektion bilden sich kernständige fibrilläre Strukturen, die mit dem nichtstrukturellen viralen p10-Protein angereichert sind (Abb.14a) und als p10-Körper bezeichnet werden. In ihrer Nähe entstehen während der Infektion bilamellare Blätter, die Calyx, die hauptsächlich aus Kohlenhydraten bestehen (Williams et al., 1989, Mackinnon et al., 1974).

Bei Wildtyp-Infektionen ordnen sich diese Strukturen in der Nähe des mit ODV-Virionen eingeschlossenen kristallinen Polyhedrins an und umhüllen dieses mit ihren

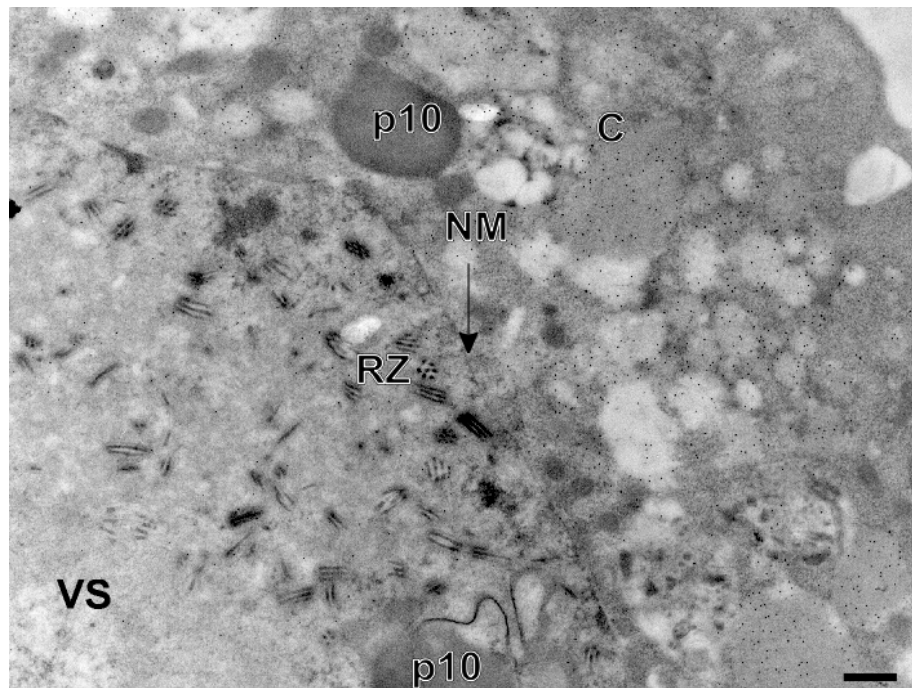




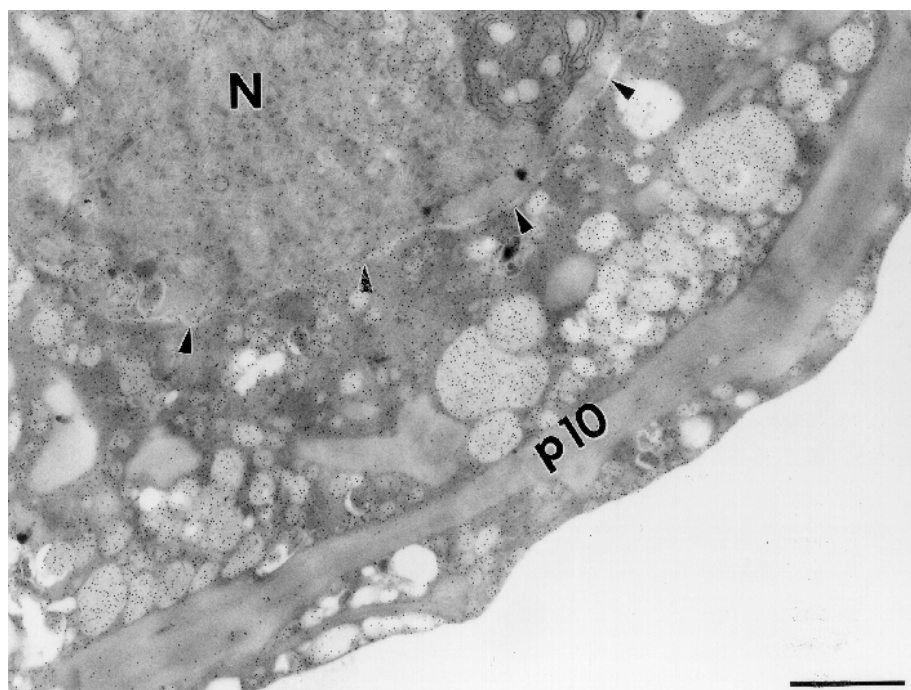
**Abb. 14a.** Entstehende p10-Körper im Kern von High Five Zellen. C, Cytoplasma; NM, Kernmembran; RZ, Ringzone; VS, Virogenes Stroma; p10, p10-Körper. Der Balken entspricht einer Größe von 0,5  $\mu\text{m}$ .

bilamellaren Blättern, wodurch die Calyx um das Polyhedrin entsteht (Williams et al., 1989). Da die Calyx bei rekombinanten Viren nicht genutzt wird, akkumuliert sie auch in der Ringzone an den p10-bodies. Während der Kern komplett umstrukturiert wird, bleiben die cytoplasmatischen Strukturen wie ER und Golgi-Apparat unverändert. Lediglich durch die starke Vergrößerung der Kernstrukturen wird das Cytoplasma, wie schon bei der Immunfluoreszenz beschrieben, in einen schmalen Raum um den Kern gedrückt (Abb.10).

Zum Zeitpunkt der zweiten Probenahme 44 h p.i., in der sich die ODV-Phase etabliert hat, sind die Auswirkungen der von Charlton und Volkmann (1993) beschriebenen cytoplasmatischen Veränderungen durch die Umordnung des Cytoskellets und des endosomalen Systems deutlich erkennbar. Besonders markant auf den elektronenmikroskopischen Bildern ist dabei die Entstehung von zunächst kleinen cytoplasmatischen p10-Körpern (Abb.14b) die in der Folgezeit Ausdehnungen von bis zu 15  $\mu\text{m}$  annehmen können (Abb.14c). Sehr auffällig ist weiterhin, daß mit der Entstehung dieser fibrillären Strukturen die distinkten Transportkompartimente des



**Abb.14b.** Entstehende p10-Körper im Kern von High Five Zellen. C, Cytoplasma; NM, Kernmembran; RZ, Ringzone; VS, Virogenes Stroma; p10, p10-Körper. Der Balken entspricht einer Länge von 0,5  $\mu\text{m}$ .

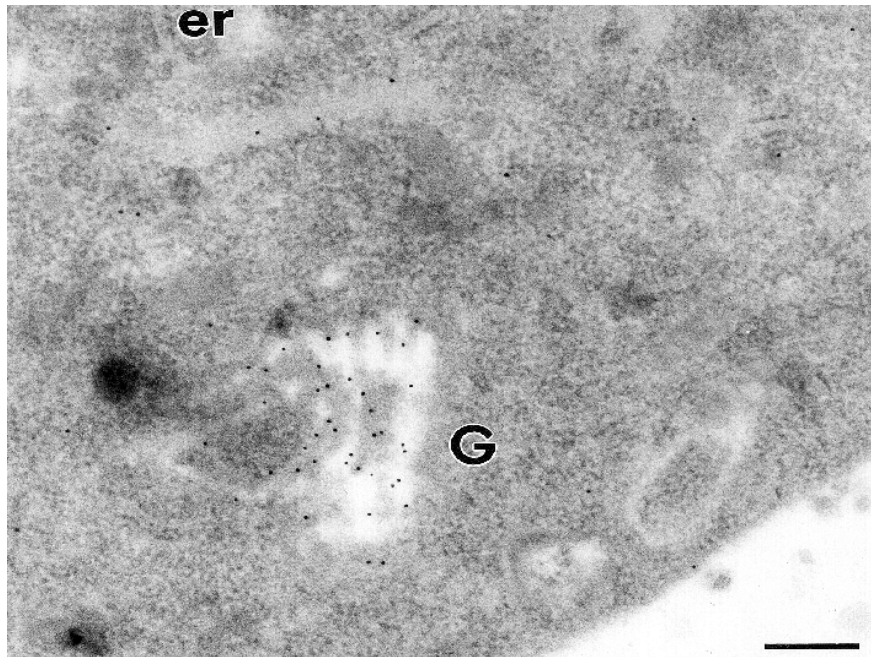


**Abb.14c.** High Five Zellen in der ODV-Phase (44 hpi.). Im Cytoplasma nehmen die p10-Körper Ausdehnungen von bis zu 15  $\mu\text{m}$  an. C, Cytoplasma; N, Kern; p10, p10-Körper. Der Balken entspricht einer Länge von 2  $\mu\text{m}$ .

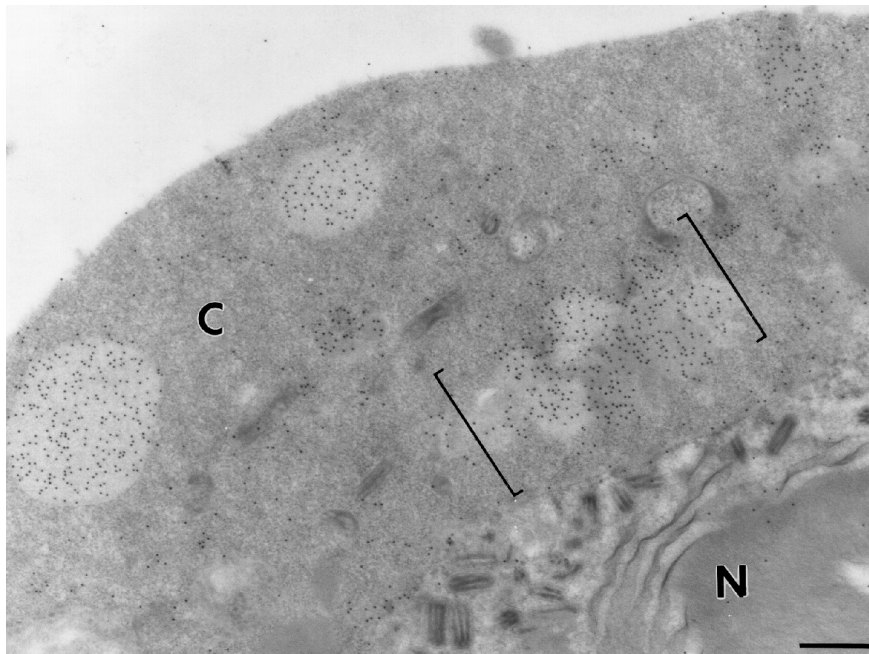
Sekretionsweges, das ER und der Golgi-Apparat, nicht mehr sichtbar sind.

Mit rekombinanten Baculovirus infizierte Sf21 Zellen zeigen im Gegensatz zu Wildtyp-infizierten Zellen eine deutlich unterschiedliche Pathologie hinsichtlich der Entwicklung der Kernstrukturen während der Infektion. So bildet sich weder die reife Form des Virogenen Stromas mit ihren charakteristischen Einheiten heraus, noch sind eine Ringzone mit *de novo* Membransynthese und die Entwicklung von p10-Körpern im Kern zu erkennen. Fast alle in den Zellen lokalisierten Viren tragen die typischen Merkmale der Progenitor-BVs. In den mit dem rekombinanten Baculovirus infizierten Sf21-Zellen vollzieht das Virus zumindest nicht die morphologischen Änderungen, die die ODV-Phase kennzeichnen. Es scheint vielmehr über den gesamten Zeitraum BVs oder Progenitorviren zu produzieren, was sich mit dem in der Literatur oft beschriebenen Phänomen deckt, daß im Vergleich zu High Five Zellen in Sf21-Zellen um eine Größenordnung höhere Titer bei der Virusvermehrung erhalten werden.

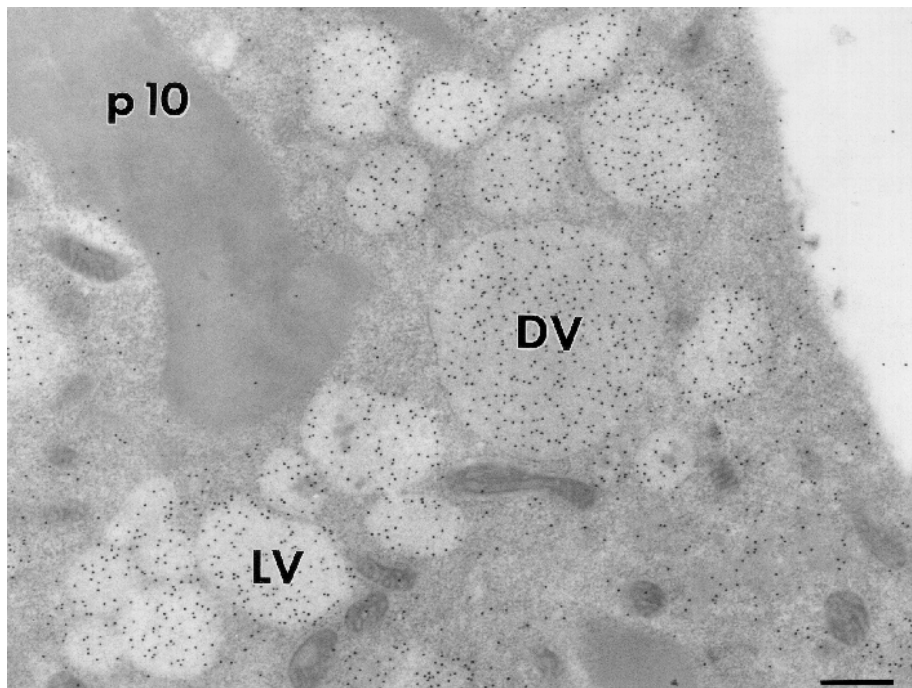
Für den Verlauf der Produktbildung des rekombinanten Modellproteins war eine genaue Betrachtung der Kompartimente des Proteinbiosynthese- und Transportapparates notwendig. So zeigt sich durch Immunogold-Markierung, daß zu sehr frühen Infektionszeitpunkten (20 h p.i.) nur sehr wenig rekombinantes  $\beta$ -TP vorhanden ist und das in den Kompartimenten des ER und des Golgi-Apparates (Abb.15) lokalisiert ist. So ist in der Übergangsphase die intrazelluläre Kompartimentierung noch intakt. Zum Zeitpunkt der zweiten Probenahme nach 44 h, in der ODV-Phase, sind das ER und der Golgi-Apparat nicht mehr identifizierbar. Das rekombinante Protein ist in einer großen Anzahl von kleineren Vesikeln lokalisiert (Abb.16, Strukturen in den eckigen Klammern). Es handelt sich dabei phänotypisch um zwei verschiedenartige vesikuläre Strukturen, um eine elektronendichte- (*dense vesikel*-DV) und eine elektronendurchlässige (*lucent vesikel*-LV) vesikuläre Struktur. Die Menge des  $\beta$ -TP ist wie aus der Immunogoldfärbung hervorgeht im Vergleich zu späteren Expressionsphasen noch relativ gering. In der Folgezeit vergrößern sich diese vesikulären Strukturen (Abb. 17) und fusionieren zu größeren (Abb.18). Gegen Ende der Infektion sind dann Megavesikel, in denen das  $\beta$ -TP massiv konzentriert ist, sichtbar. Diese Megavesikel



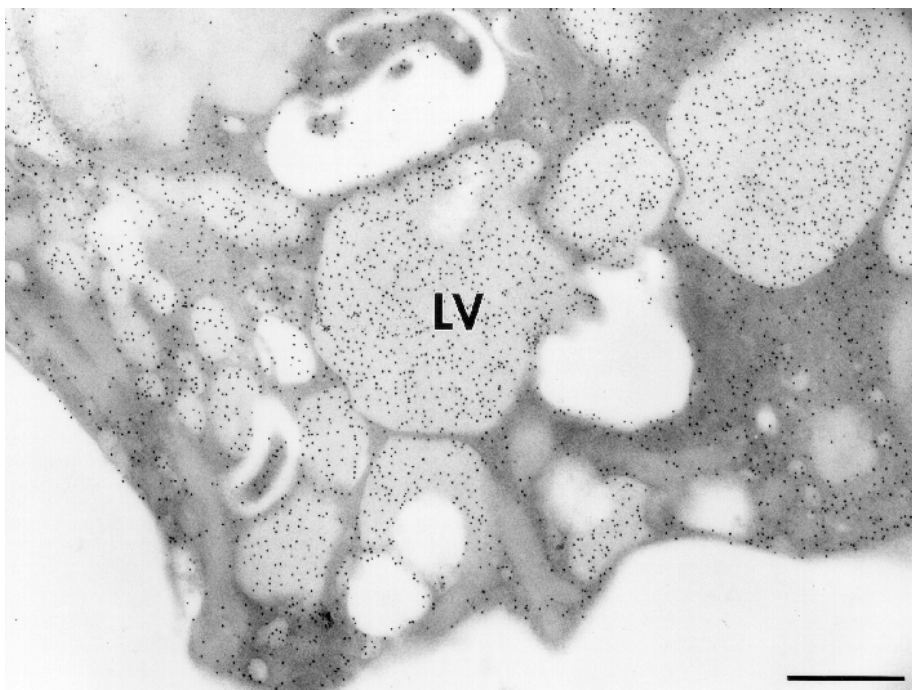
**Abb. 15.** Produktbildung des  $\beta$ -TP in High Five Zellen. Ausschnitt aus dem Cytoplasma einer AcMNPV- $\beta$ -TP-infizierten Zelle in der Übergangsphase zwischen BV- und ODV-Phase (20 h p.i.). ER, Endoplasmatisches Retikulum; G; Golgi-Apparat. Der Balken entspricht einer Länge von 0,25  $\mu$ m.



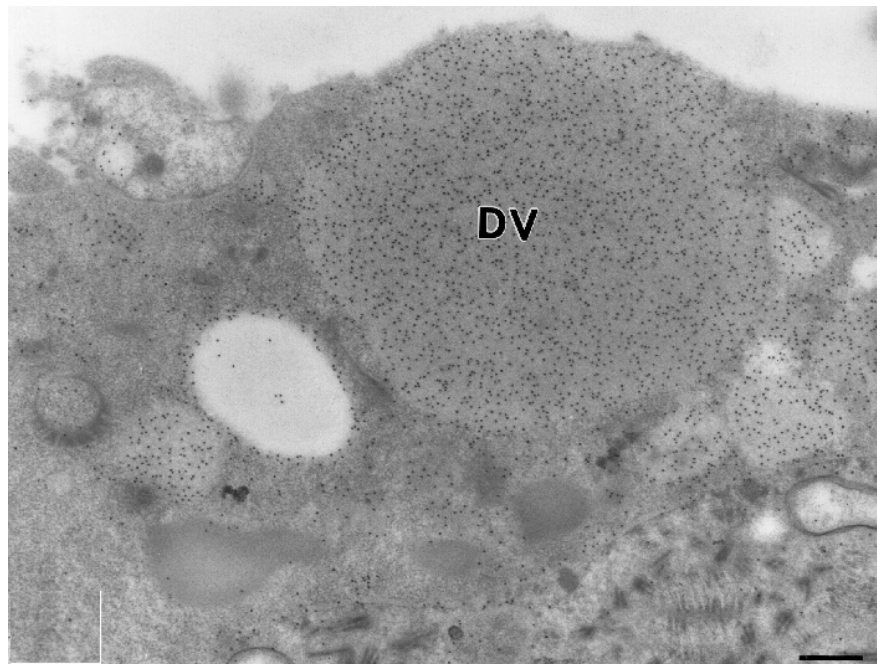
**Abb. 16.** Produktbildung des  $\beta$ -TP in High Five Zellen. Ausschnitt aus dem Cytoplasma einer AcMNPV- $\beta$ -TP-infizierten Zelle in der ODV-Phase (44 h p.i.). Der Bereich in den eckigen Klammern kennzeichnet den Bereich, in dem sich kleinere elektronendichte- (dense vesikel, DV) und elektronendurchlässige (lucent vesikel, LV) vesikuläre Strukturen assoziieren. C, Cytoplasma; N, Kern; NM; Kernmembran; Der Balken entspricht einer Größe von 1,5  $\mu$ m.



**Abb.17.** Ausschnitt aus dem Cytoplasma einer AcMNPV- $\beta$ -TP-infizierten Zelle in der ODV-Phase. Nach der Assoziierung von kleineren Vesikeln (Abb.15) entstehen im weiteren Verlauf der Infektion zwei morphologisch verschiedenartige Vesikel: elektronendichte (DV) und elektronendurchlässige (LV) Vesikel. p10, cytoplasmatischer p10-Körper. Der Balken entspricht einer Länge von 0,5  $\mu$ m.



**Abb.18.** Elektronendichte (DV) und elektronendurchlässige (LV) Vesikel mit dem darin enthaltenen  $\beta$ -TP scheinen sich durch Fusion zu vergrößern. In der Abbildung sind vergrößerte LVs dargestellt. Der Balken entspricht einer Länge von 1  $\mu$ m.

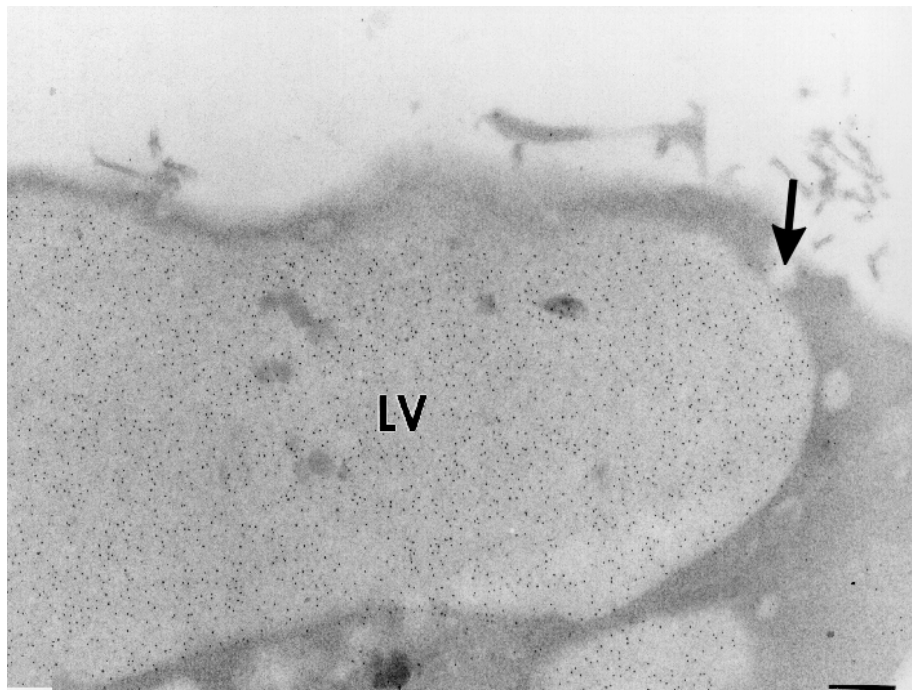


**Abb. 19.** Ausschnitt aus dem Cytoplasma einer AcMNPV- $\beta$ -TP-infizierten High Five Zelle in der ODV-Phase (68 h p.i.). Das rekombinante  $\beta$ -TP lagert sich in Megavesikeln ab. DV, dense vesicle; Der Balken entspricht einer Länge von 1  $\mu$ m.

können Ausdehnungen von bis zu 7  $\mu$ m besitzen (Abb. 19). Ein gewisser Teil des neu gebildeten rekombinanten Proteins scheint aber trotz dieser massiven Okkupation des Proteinsynthese- und Transportapparates noch sekretiert zu werden, da das  $\beta$ -TP über den gesamten Infektionsverlauf auch in kleinen Vesikeln in der Nähe der Plasmamembran und außerhalb lokalisiert ist (Abb. 15-19).

Trotz der etwas anderen Viruspathogenese bei Sf21 zeigen sich im cytoplasmatischen Raum im Vergleich zu High Five Zellen keine signifikanten Unterschiede. So wird das rekombinante Protein zunächst ebenfalls im ER und im Golgi-Apparat lokalisiert und es bilden sich die zuvor beschriebenen vesikelartigen Strukturen, die anschließend zu großen Vesikeln fusionieren (Abb. 20). Unklar ist dabei, ob das in diesen Strukturen akkumulierte rekombinante Protein erst nach erfolgter Zellyse aus den Zellen in den Überstand gelangt oder ob diese Megavesikel auch mit der Plasmamembran fusionieren und so das rekombinante Protein in den Überstand abgeben können. Eine solche Stelle ist in Abb. 20 durch einen Pfeil markiert.





**Abb.20.** Ausschnitt aus dem Cytoplasma einer AcMNPV- $\beta$ -TP-infizierten Sf21 Zelle in der ODV-Phase (68 h p.i.). Das rekombinante  $\beta$ -TP lagert sich in Megavesikeln ab. Möglicherweise können diese Megavesikel mit der Plasmamembran einen Kontakt herstellen und so das rekombinante Protein ausschleusen (Pfeil). LV, lucent vesicle; Der Balken entspricht einer Länge von 1  $\mu$ m..

Um die Frage zu klären aus welchem/n Kompartiment/en sich die entstehenden Vesikel mit dem darin akkumulierten  $\beta$ -TP entwickelt haben, sollten Doppelmarkierungen des  $\beta$ -TP mit kompartimentspezifischen Antikörpern etabliert werden. Hierfür wurden die kommerziell erhältlichen Antikörper gegen BiP (Heavy Chain Binding Protein), PDI (Protein-Disulfid-Isomerase), Calnexin und Calreticulin (alle ER-spezifisch) und die Antikörper gegen das Golgi 58k- und das TGN38-Protein (Trans-Golgi-Network) getestet. Diese zeigten jedoch mit Insektenzellen keine Kreuzreaktionen, so daß sie für diese Fragestellungen nicht verwendet werden konnten. Für die Beantwortung dieser Fragestellung mit dieser Methode ist es daher wichtig, entsprechende kompartimentspezifische Antikörper herzustellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde darauf verzichtet, da die Herstellung recht zeitintensiv ist und alternativ der Ursprung der sich bildenden und fusionierenden vesikulären Strukturen auch über die Charakterisierung der N-Glycan-Ketten des rekombinanten Modellproteins erfolgen kann.

### **Zusammenfassung**

Wie hier für die beiden Wirtszelllinien gezeigt, hat das Virus zum Zeitpunkt der Produktexpression die Kontrolle über die Wirtszellstoffwechselwege übernommen. In der Übergangsphase ist dabei die intrazelluläre Kompartimentierung noch intakt und das rekombinante Protein in den Kompartimenten des Sekretionsweges nachweisbar. Mit der Etablierung der ODV-Phase, hervorgerufen durch die Umordnung des Cytoskeletts, sind diese Kompartimente (ER und Golgi-Apparat) nicht mehr nachweisbar. Vielmehr ist das rekombinante Protein in vielen kleinen vesikulären Strukturen lokalisiert, die sich im Verlauf der Infektion zu fusionieren scheinen und Megavesikel bilden. Morphologisch können diese Strukturen in elektronendichte (DV) und elektronendurchlässige (LV) vesikuläre Strukturen unterschieden werden. Die Probleme der Akkumulation rekombinanter Proteine unter dem Polyhedrin-Promotor gehen somit mit dem Lebenszyklus der Baculoviren einher. Es ist daher notwendig, die beiden Phasen der Baculovirusinfektion (Übergangsphase und ODV-Phase), die hier durch elektronenmikroskopische Methoden näher untersucht wurden, auch proteinbiochemisch zu analysieren, wie in den folgenden Abschnitten geschehen.

### **3.3. Biosynthese und Sekretion des $\beta$ -TP in Baculovirus-infizierten Insektenzellen**

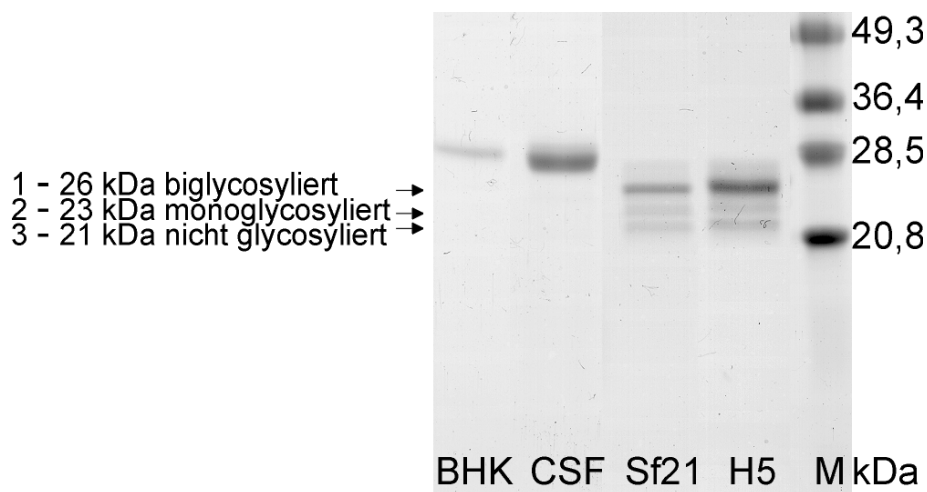
#### **3.3.1. Charakterisierung des intra- und extrazellulären $\beta$ -TP in Insektenzellen**

Wie bereits mehrfach erwähnt, zeigen die aus Insektenzellen hergestellten Proteine einige signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer posttranslationalen Modifikationen wie z.B. der Glycosylierung im Vergleich zu ihren aus den natürlichen Quellen oder anderen eukaryotischen Expressionssystemen stammenden Gegenstücken. Zur einführenden Charakterisierung des Modellproteins wurde das aus verschiedenen Wirten stammende Protein jeweils in ein Slot auf ein SDS-Gel unter reduzierten Bedingungen ( Zugabe von DTT) aufgetragen und analysiert. Getrennt wurden dabei



das natürliche  $\beta$ -TP aus der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), konstitutiv sekretiertes  $\beta$ -TP aus rekombinanten BHK-21 Zellen und das aus den Überständen isolierte  $\beta$ -TP aus Baculovirus-infizierten Sf21- und High Five Zellen.

Wie aus Abb. 21 zu erkennen läuft das  $\beta$ -TP aus der CSF mit einem apparenten Molekulargewicht von 26-27 kDa. Diese Bande entspricht der zweifach glycosylierten Form des Proteins mit der Gewebe-typischen *brain-type* Glycosylierung. Es handelt sich also um unvollständige *complex-type* Oligosaccharide mit geringem Sialyierungsgrad (Hoffmann et al., 1993, 1994). Das aus rekombinanten BHK-21 Zellen konstitutiv sekretierte  $\beta$ -TP weist ein etwas höheres apparentes Molekulargewicht aufgrund seiner für diese Wirtszellen spezifischen hochsialylierten Antennen mit biantennär *complex-type* Glycosylierung auf (Grabenhorst et al. 1995).

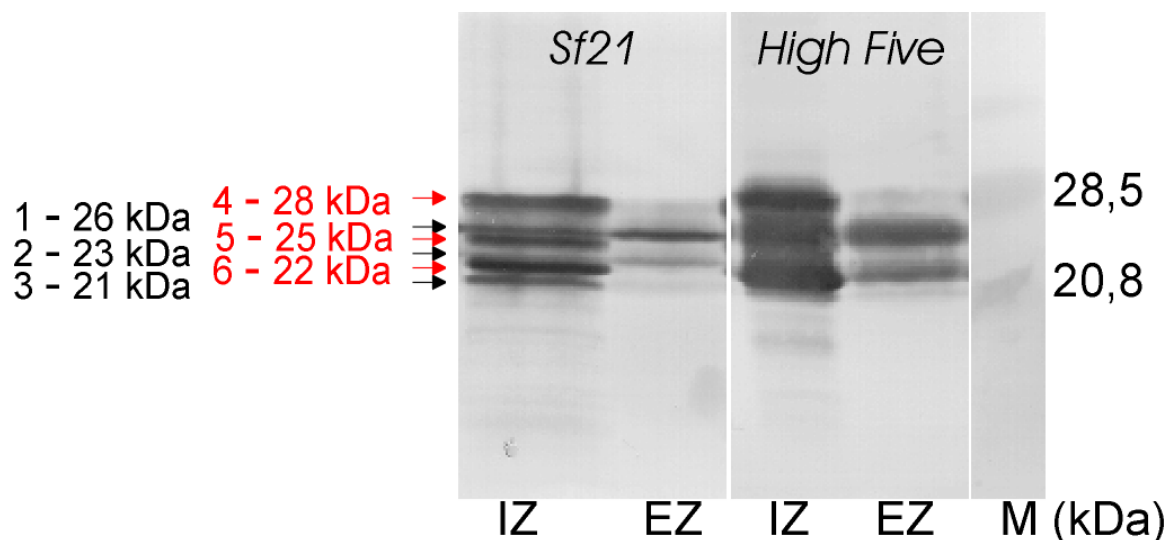


**Abb.21.** SDS-PAGE Analyse des  $\beta$ -TP aus verschiedenen Expressionssystemen unter reduzierten Bedingungen (+DTT). CSF, Cerebrospinalflüssigkeit; BHK, rekombinante BHK-21 (Baby Hamster Kidney) Zellen; Sf21, Sf21 Zellen; H5, High Five Zellen; M, Molekulargewichtsmarker.

Insektenzellen sind dagegen nur in der Lage, relativ simple paucimannosidische (*truncated*) Strukturen mit 2-3 Mannosen und proximalen Fucosen zu synthetisieren. Daraus resultiert eine deutlich höhere Mobilität des Proteins aus diesen Quellen bei 26 kDa (Bande 1). Zusätzlich zu dieser Bande sind noch mindestens zwei weitere Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 23 kDa (Bande 2) und 21 kDa (Bande 3) zu erkennen, die aufgrund der zwei zur Verfügung stehenden potentiellen

Glycosylierungsstellen des  $\beta$ -TP eine Unterbesetzung der Glycosylierungsstellen (einfach und nicht glycosyliertes  $\beta$ -TP) repräsentieren, wie aus vorhergehenden Untersuchungen bekannt ist (Pohl et al., 1997).

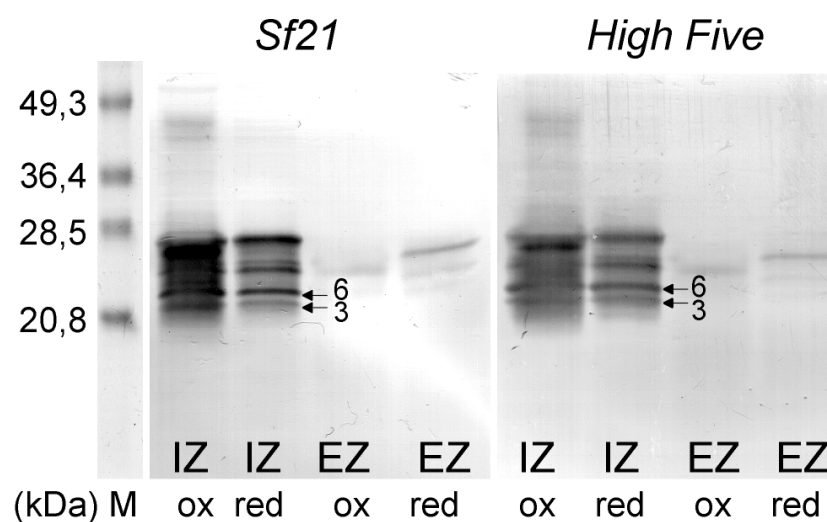
Zur Charakterisierung des intrazellulären Bandenmusters des  $\beta$ -TP aus Insektenzellen wurden  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  Sf21 und High Five Zellen mit einer MOI=3 infiziert, nach 48 h aufgearbeitet, durch *western blotting* unter reduzierten Bedingungen analysiert und mit den extrazellulären Proteinformen verglichen (Abb. 22). Da im Zellüberstand Medienkomponenten durch eine sonst übliche Ethanol-Fällung mit ausfallen und alternativ sonst jedesmal eine Affinitätschromatographie hätte durchgeführt werden müssen, wurde aufgrund der einfachen Handhabung der Überstand 1:2 mit Probenpuffer verdünnt. Um die intrazellulären Veränderungen bzw. die Akkumulation des Modellproteins auch zu sehr frühen Infektionszeitpunkten zu detektieren, wurde beim Auftrag der Proben ein Verhältnis der intrazellulären zu den extrazellulären Proben von 5:1 gewählt (Abb. 22). Extrazellulär zeigt sich die zuvor diskutierte Bandenstruktur (siehe Abb. 21) mit den drei Hauptbanden bei 26, 23 und 21 kDa.



**Abb.22.** Western Blot des intra- und extrazellulären  $\beta$ -TP 48 h nach Baculovirusinfektion in Sf21 und High Five Zellen. IZ, intrazellulär, EZ, extrazellulär, M, Molekulargewichtsmarker. Das intrazelluläre  $\beta$ -TP wird hauptsächlich durch die Banden 4-6 repräsentiert. Daneben ist intrazellulär auch das extrazelluläre Bandenmuster vorhanden.

Das intrazelluläre Bandenspektrum des exprimierten rekombinanten Modellproteins in infizierten Sf21 Zellen ist dagegen sehr viel heterogener. Das extrazelluläre Bandenspektrum ist, wenn auch schwach, in dieser Fraktion deutlich erkennbar (Banden 1-3). Der Hauptanteil des intrazellulären  $\beta$ -TP ist aber durch drei weitere Banden charakterisiert, die bei 28 kDa (Bande 4), bei 25 kDa (Bande 5) dicht unter der biglycosylierten sekretorischen Form (26 kDa) und bei 22 kDa (Bande 6) zwischen den vermeintlich unterglycosylierten sekretorischen Formen (23 und 21 kDa) migrieren. Das aus High Five Zellen stammende intrazelluläre  $\beta$ -TP weist das gleiche Bandenspektrum im Western Blot auf.

Zur weiteren Charakterisierung sollte geklärt werden, ob der Thiol/Disulfidstatus des rekombinanten Modellproteins einen entscheidenden Einfluß auf die Heterogenität des intrazellulären Bandenmusters im SDS-Gel hat. Dazu wurden Proben des  $\beta$ -TP aus Sf21 und High Five Zellen in Probenpuffer unter jeweils oxidierten (keine Zugabe von DTT) und unter reduzierten Bedingungen (Zugabe von DTT) aufgenommen und durch SDS-PAGE/*western blotting* analysiert (Abb 23).



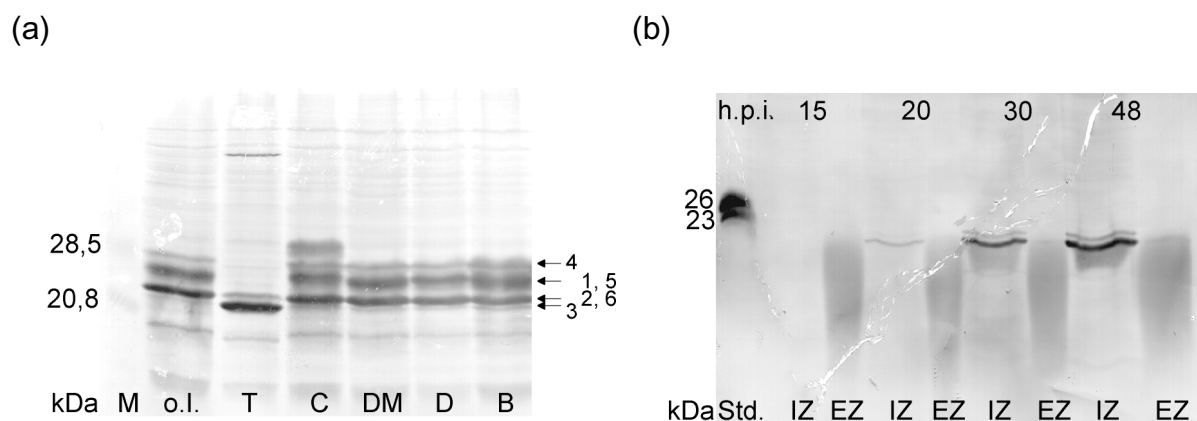
**Abb.23.** Western Blot des  $\beta$ -TP aus Insektenzellen. Die Proben wurden 48 h p.i. entnommen, aufgearbeitet, einer SDS-PAGE unterzogen und durch western blotting visualisiert. Die intrazellulären Proben sind um den Faktor 5 konzentrierter aufgetragen. Die Pfeile kennzeichnen die Proteinbanden 3 (21 kDa) und 6 (22 kDa) des intrazellulären  $\beta$ -TP. Diese Proteinformen sind nicht sensitiv gegenüber der Reduktion. IZ, intrazellulär; EZ, extrazellulär; ox, -DTT; red., +DTT; M, Molekulargewichtsmarker.

Wie aus Abbildung 23 eindeutig hervorgeht laufen die verschiedenen intra- und extrazellulären Proteinformen des  $\beta$ -TP vor und nach Reduktion im gleichen Molekulargewichtsbereich. Daraus läßt sich schließen, daß die einzelnen Proteinformen nicht über intermolekulare Disulfidbrücken unter Ausbildung von Dimeren etc. assoziieren, sondern vielmehr als Monomere vorliegen. Unter oxidierten Bedingungen (-DTT) laufen alle Proteinbanden des intra- und extrazellulären  $\beta$ -TP bis auf die Banden 3 und 6 mit einem niedrigeren apparenten Molekulargewicht im SDS-Gel, was zeigt, daß bei diesen Proteinformen intramolekulare Disulfidbrücken vorliegen. Die Banden 3 und 6 ändern ihr apparentes Molekulargewicht unter oxidierenden Bedingungen im Vergleich zu reduzierenden Bedingungen nicht. Sie besitzen anscheinend keine intramolekularen Disulfidbrücken. Bei allen hier detektierten Proteinformen des  $\beta$ -TP ist es jedoch mit dieser Methode nicht möglich zu entscheiden, ob bestimmte Proteinformen gemischte Disulfide mit Glutathion (Prot-S-S-Glutathion) besitzen und/oder ob einzelne oder mehrere Thiole des Modellproteins oxidiert sind, so daß dann letztendlich ein niedrigeres apparentes Molekulargewicht dieser Proteine entsteht. Es zeigt sich also insgesamt, daß der Thiol/Disulfidstatus entscheidend für die Akkumulation des rekombinanten Modellproteins in diesem Expressionssystem sein kann, so daß es sehr wichtig ist, diesen bezüglich intramolekularer Disulfidbrücken, gemischter Disulfide und verschiedener Oxidationsstufen von einzelnen Thiolen detailliert auf molekularer Ebene durch die modernen Methoden wie MALDI/TOF-MS zu untersuchen.

### **3.3.2. Einfluß von Glycosylierungsinhibitoren auf das intrazellulär akkumulierte $\beta$ -TP**

Um zu überprüfen, ob der Thiol/Disulfidstatus des  $\beta$ -TP an bestimmte Glycosylierungsmuster gebunden ist, erfolgten Proteinexpressionen des Modellproteins in 100 ml Suspensionskulturen bei einer MOI=3 unter Supplementierung von Glycosylierungsinhibitoren. Mit diesen Inhibitoren kann die Glycosylierung an ganz bestimmten Stellen gestoppt werden, so daß Proteine mit veränderten oder fehlenden N-Glycanen gebildet

werden. Verwendet wurden dabei die Glycosylierungsinhibitoren Tunicamycin, Castanospermin, Desoxynojirimycin, Desoxymannonojirimycin und der Transportinhibitor Brefeldin A. Tunicamycin ist ein Inhibitor, der durch Hemmung des Dolicholstoffwechsels die N-Glycosylierung unterbindet und so de-N-glycosylierte Proteinketten generiert. Castanospermin und Desoxynojirimycin inhibieren die Glucosidasen I und II, also die ersten *Trimming*-Schritte der N-Glycosylierung und erzeugen so N-Glycane mit der Struktur  $\text{Glc}_3\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$ . Desoxymannonojirimycin, ein Mannosidase I-Inhibitor, bildet N-Glycane mit der Struktur  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  und Brefeldin A hemmt die Translokation von Proteinen vom endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat. Abb. 24a zeigt die Western Blot Analyse von  $\beta$ -TP aus Baculovirus-infizierten Zellen unter dem Einfluß der verschiedenen Inhibitoren (36 hpi).



**Abb.24.** (a) Intrazelluläre Fraktionen des  $\beta$ -TP aus High Five Zellen, kultiviert mit verschiedenen Proteinbiosyntheseinhibitoren. o.l., ohne Inhibitor; T, 10  $\mu\text{M}$  Tunicamycin; C, 100  $\mu\text{M}$  Castanospermin; DM, 50  $\mu\text{M}$  Desoxymannonojirimycin; D 50  $\mu\text{M}$  Desoxynojirimycin; B, 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Brefeldin A. Die mit den Pfeilen markierten Proteinbanden bezeichnen die Nomenklatur des zuvor detektierten intrazellulären Bandenmusters (siehe Abb.22) (b) Kinetik der Produktbildung des  $\beta$ -TP unter Verwendung von 30  $\mu\text{M}$  Tunicamycin. IZ, intrazellulär; EZ, extrazellulär; h.p.i., Stunden nach der Infektion; M, Molekulargewichtsmarker.

Wie deutlich auf dem Blot zu erkennen, ist ohne Inhibitor das intrazelluläre Bandenspektrum wie unter 3.3.1. diskutiert sichtbar. Die Proteinformen 1 und 5 bzw. 2 und 6 werden nicht mehr aufgelöst und laufen als breite Bande. Da die Proteinformen der Banden 1 und 2 im Vergleich zu den Proteinformen 5 und 6 deutlich unterrepräsentiert sind, werden diese Doppelbanden im folgendem als Banden 5 und

6 bezeichnet. Durch die Supplementierung von Tunicamycin entstehen zwei Banden, die den Banden 6 und 3 mit dem apparenten Molekulargewicht von 22 und 21 kDa der Aufarbeitung ohne Inhibitor entsprechen. Dabei liegt die Bande mit der höheren Mobilität in der absoluten Majorität vor. Die untere Bande charakterisiert demnach eindeutig eine unglycosylierte Proteinkette. Die obere Bande tritt in allen Proben auf und verändert sich auch durch die Verwendung der Inhibitoren nicht, so daß es sich um eine zweite unglycosylierte Form des  $\beta$ -TP handeln könnte. Um zu entscheiden, ob es sich um eine echte durch Tunicamycin verursachte Bande handelt und nicht um ein durch zu niedrige Konzentration des Inhibitors verursachtes Nebenprodukt, wurde eine Kultur AcMNPV- $\beta$ -TP mit der dreifachen Konzentration an Tunicamycin infiziert, zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. aufgearbeitet und durch SDS-PAGE/*western blotting* analysiert (Abb. 24b). Es zeigt sich deutlich, daß neben der Hauptbande immer auch die andere Bande entsteht, wobei sich das Verhältnis der Intensitäten über die Zeit nicht ändert. Demnach stellt diese Bande sehr wahrscheinlich eine zweite unglycosylierte Form des  $\beta$ -TP dar. Da durch diesen Inhibitor keine weiteren Banden generiert werden, handelt es sich bei allen anderen produzierten Banden ohne Inhibitoren um glycosylierte Formen des Modellproteins.

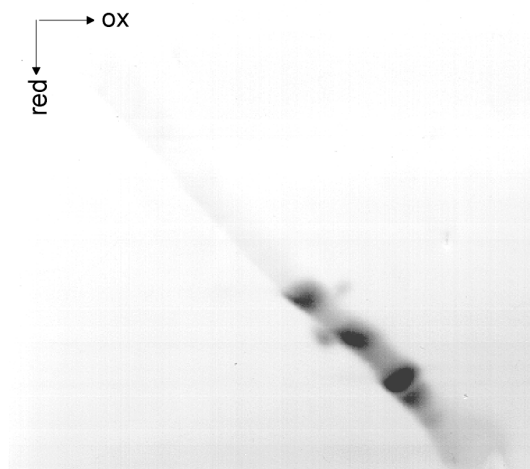
Durch Castanospermin, dem Gucosidase I, II Inhibitor, der erste *Trimming*-Schritte der Glycoprotein-Prozessierung unterbindet, entstehen, wie aus Abb.20a hervorgeht, bei ca. 29 kDa und 26 kDa zwei neue Banden, während die Bande 4 (28 kDa) nur sehr schwach und die Bande 5 (25 kDa) nicht detektierbar sind. Damit repräsentieren die Proteinformen der Banden 4 und 5 wahrscheinlich schon weiter prozessierte Glycosylierungsintermediate, die an beiden bzw. an einer potentiellen Stelle N-glycosyliert sind.

Alle anderen verwendeten Inhibitoren haben anscheinend keinen oder nur marginalen Einfluß auf das Glycosylierungsmuster des intrazellulären  $\beta$ -TP. Insgesamt läßt das durchgeführte Experiment die Schlußfolgerung zu, daß die intrazellulär akkumulierten Proteinketten des  $\beta$ -TP neben nicht glycosylierten Formen hauptsächlich durch Biosyntheseintermediate gekennzeichnet sind. Desweiteren zeigt sich sehr deutlich,

daß der Thiol/Disulfidstatus einen entscheidenden Einfluß auf das Glycosylierungsmuster des verwendeten Modellproteins hat. Die glycosylierten Biosyntheseintermediate (Banden 1, 2, 4 und 5) besitzen dabei wie unter 3.3.1 intramolekulare Disulfidbrücken. Bei den Banden 3 und 6 handelt es sich hingegen um Proteinformen, die nicht sensitiv gegenüber der Reduktion mit DTT sind und demzufolge keine intramolekularen Disulfidbrücken besitzen. Wie hier gezeigt werden konnte, sind diese Proteinketten nicht glycosyliert. Nicht geklärt werden kann mit dieser Methodik natürlich die Fragestellung, ob diese Proteinketten prinzipiell nicht glycosyliert werden oder ob sie nach erfolgter Glycosylierung intrazellulär de-N-glycosyliert werden. Für die Beantwortung dieser Fragestellung sind moderne analytische Methoden wie die MALDI/TOF-MS notwendig, mit denen man die Glycosylierungsstellen detailliert auf molekularer Ebene analysieren kann.

### **3.3.3. Einfluß von Proteasen auf die Integrität des intrazellulären $\beta$ -TP**

Ein literaturbekanntes Problem bei der Herstellung rekombinanter Proteine in Insektenzellen stellen sowohl exoproteolytische als auch endoproteolytische Spaltungen des gewünschten Produktes dar (Grabenhorst, 1994, Smith et al., 1985, Hasegawa, 1992). Deshalb wurde für die Analyse von möglichen N-terminalen Veränderungen intrazelluläres  $\beta$ -TP immunaffinitätschromatographisch aufgereinigt und ein Western Blot angefertigt, der mit Coomassie R-250 gefärbt wurde. Die einzelnen Banden wurden dann anschließend über 6-10 Zyklen ansequenziert. Dabei zeigte sich, daß das  $\beta$ -TP keinen exoproteolytischen Spaltungen unterlegen war. Grabenhorst beobachtete 1994 bei der in Insektenzellen hergestellten IL-2-Variante IL-Mu30 eine endoproteolytische Spaltung, die über Disulfidbrücken verknüpft war und erst unter reduzierten Bedingungen deutlich sichtbar wurde. Um diese Möglichkeit der Endoproteolyse auch in Bezug auf das gewählte Modellprotein zu prüfen, wurde eine intrazelluläre Probe in einem oxidierenden Probenpuffer (48 h p.i.) auf ein SDS-Gel der Dicke 0,7 mm aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Dieser Gelstreifen mit den getrennten Proteinformen wurde ausgeschnitten und für 30 min in einem Trispuffer mit 65 mmol l<sup>-1</sup> DTT inkubiert. Anschließend wurde dieser Gelstreifen analog der



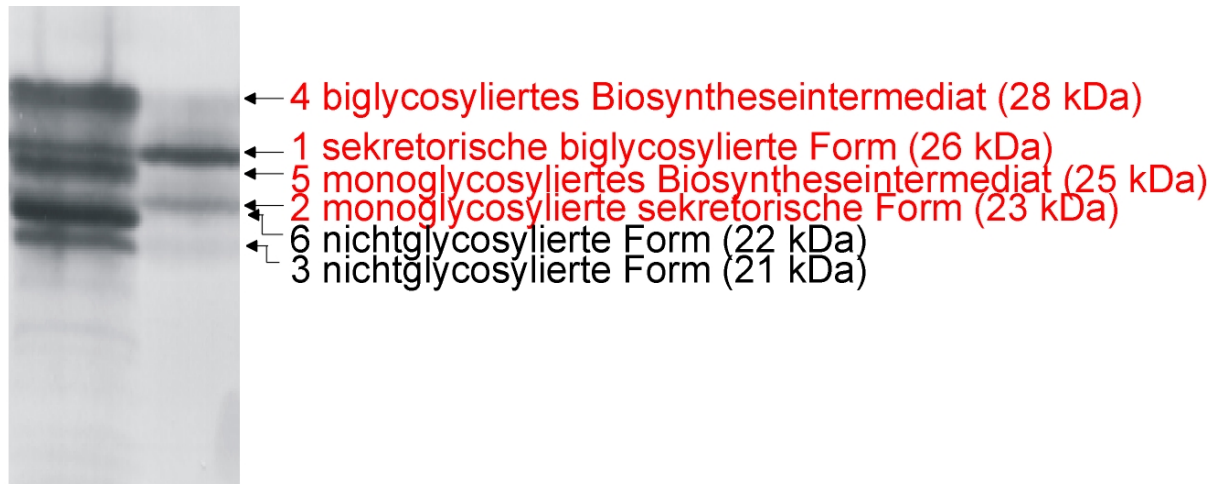
**Abb.25.** 2D-PAGE des intrazellulären  $\beta$ -TP aus infizierten High Five Zellen 48 h nach der Infektion. Die Probe wurde in der ersten Dimension oxidativ (-DTT) und in der zweiten Dimension unter reduzierenden Bedingungen getrennt. (+DTT).

2D-Gelelektrophorese auf ein zuvor gefertigtes Trenngel gelegt, mit Agarose vergossen und erneut getrennt (Abb. 25). Deutlich ist zu erkennen, daß die Proteinbanden in diagonalen Richtung aufgetrennt sind. Daraus läßt sich schließen, daß das  $\beta$ -TP keinen endoproteolytischen Veränderungen unterliegt. Denn bei vorhandener Endoproteolyse müßten in reduzierender Richtung mehrere Banden mit niedrigerem apparenten Molekulargewicht auftreten oder zumindest eine Abweichung von der Diagonalen sichtbar sein.

### Zusammenfassung der Charakterisierung des intrazellulären $\beta$ -TP

- S Das intrazelluläre  $\beta$ -TP beinhaltet, wie durch SDS-PAGE/*western blotting* gezeigt werden konnte, zu einem geringen Anteil die sekretorischen Formen des Modellproteins (Banden 1-3) mit den apparenten Massen 26, 23 und 21 kDa. Der Hauptanteil des intrazellulären Proteins ist durch drei weitere Banden (4-6) mit den apparenten Massen 28, 25 und 22 kDa charakterisiert (Abb.26).
- S Bei den Proteinbanden 1, 2, 4 und 5 handelt es sich um glycosylierte Proteinformen mit intramolekularen Disulfidbrücken (Abb. 26, rot hervorgehoben). Die Proteinformen der Banden 3 und 6 sind nicht glycosyliert und besitzen keine intramolekularen Disulfidbrücken (schwarz beschriftet).
- S Das rekombinante Modellprotein ist nicht durch Exo- oder Endoproteolyse fragmentiert.





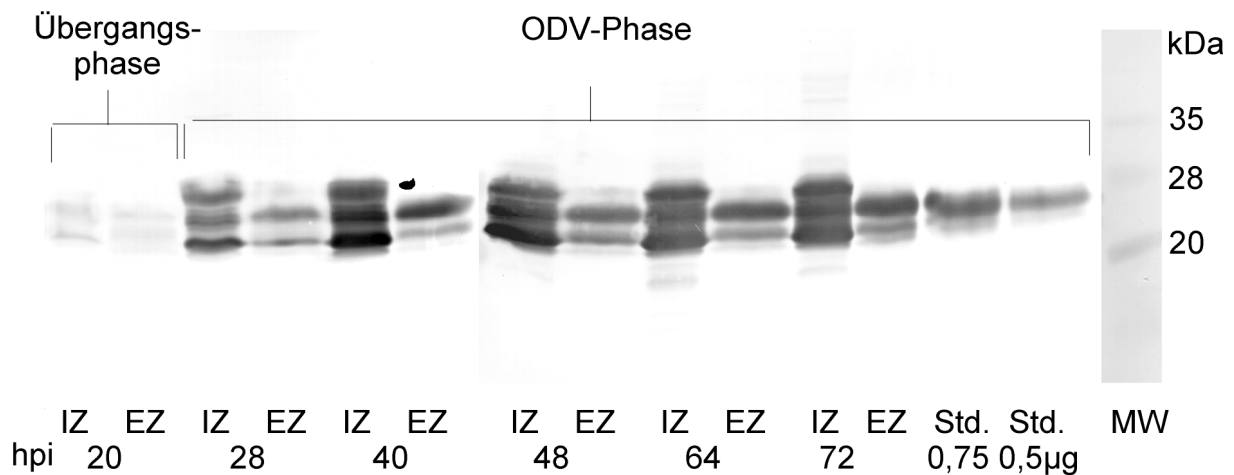
**Abb.26.** Charakterisierung der intrazellulären Proteinbanden des  $\beta$ -TP.

### 3.3.4. Kinetik der Produktbildung von $\beta$ -TP in infizierten Insektenzellen

#### 3.3.4.1. Untersuchung der Produktbildung des $\beta$ -TP durch *western blotting*

Der zeitliche Verlauf der Expression des  $\beta$ -TP in Baculovirus-infizierten High Five und Sf21 Zellen wurde zunächst durch *western blotting* der nach verschiedenen Zeitpunkten p.i. (nach Infektion) gewonnenen Zellhomogenate und Kulturüberstände untersucht. Dazu wurden Insektenzellen bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  mit einer  $\text{MOI}=3$  infiziert. Die Aufarbeitung der Proben sowie die SDS-PAGE mit anschließendem *western blotting* erfolgte wie unter 2.14.1. bzw. 2.14.2. beschrieben. Um die intrazellulären Veränderungen bzw. die Akkumulation des Modellproteins auch zu sehr frühen Infektionszeitpunkten zu detektieren, wurde beim Auftrag der Proben ein Verhältnis der intrazellulären zu den extrazellulären Proben von 5:1 gewählt (Abb. 27).

Bei der extrazellulären Fraktion zum Zeitpunkt 20 h nach der Infektion handelt es sich um eine Mischung aus schon konstitutiv sekretiertem  $\beta$ -TP und dem Protein, das durch die Infektion mit dem Virusstock in die Suspensionskultur eingetragen wurde. Im weiteren Verlauf der Infektion erhöht sich die Konzentration des  $\beta$ -TP im Überstand, wobei durch die beginnende Lyse der Zellen auch die intrazellulären Proteinformen in geringen Mengen in das Medium gelangen. Die Analyse der intrazellulären



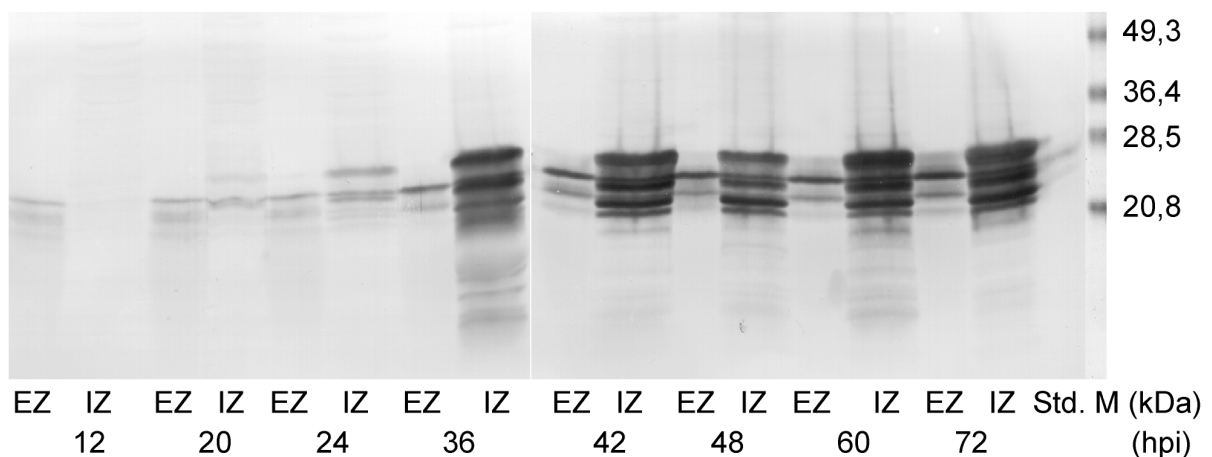
**Abb.27.** Zeitlicher Verlauf der  $\beta$ -TP Produktbildung in Baculovirus-infizierten High Five Zellen. Die Zellen einer 100 ml Suspensionskultur wurden in einer 500 ml Spinnerflasche bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  mit einer  $\text{MOI}=3$  infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden  $1 \times 10^6$  Zellen aufgearbeitet und 10 % des Ansatzes auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der Überstand wurde 1:2 mit Probenpuffer verdünnt und 2 % auf das Gel gegeben. Insgesamt ergab sich dadurch ein Verhältnis der intrazellulären Fraktionen (IZ) zu den extrazellulären Fraktionen (EZ) von 5:1. Als Standard diente ein aus infizierten High Five Zellen aufgereinigtes rekombinantes  $\beta$ -TP.

Fraktionen zeigt, daß nach 28 h Infektionszeit stets nur ca. 50 % des insgesamt exprimierten rekombinanten Proteins sekretiert werden, während der Rest mit den Zellen assoziiert bleibt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der einführenden Charakterisierung der Produktbildung des  $\beta$ -TP (siehe 3.1.). Interessanterweise zeigt die Probe nach 20 h, also in der Übergangsphase von der BV-Produktionsphase zur ODV-Phase, eine deutlich andere Qualität bezüglich des intrazellulären Bandenmusters des  $\beta$ -TP im Vergleich zu den intrazellulären Proben der ODV-Phase ab 28 h. So sind intrazellulär lediglich die sekretorischen Formen des bi- bzw. monoglycosylierten  $\beta$ -TP (Banden 1 und 2) präsent. Nur kurze Zeit später, nach 28 h bildet sich das zuvor besprochene Bandenmuster heraus, das dann über den gesamten weiteren Infektionsverlauf in seiner Qualität unverändert bleibt. Dabei akkumulieren die Banden 4 (28 kDa), 2, 5 (ca. 25 kDa) und 3, 6 (ca. 22 kDa).

Wie aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen klar wurde, gehen die Probleme der Akkumulation des rekombinanten Proteins unter dem Polyhedrin-Promotor mit dem Lebenszyklus der Baculoviren einher (siehe 3.2.2.). Aus den erhaltenen Ergebnissen zeigt sich zweifelsfrei, daß sich die auf morphologischer

Ebene erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Kinetik der Produktbildung des rekombinanten  $\beta$ -TP mit den Ergebnissen der biochemischen Analyse der Produktbildung korrelieren lassen. So sind in der Übergangsphase die Transportkompartimente des Sekretionsweges (ER und Golgi-Apparat) noch eindeutig identifizierbar. In dieser Phase sind intrazellulär lediglich die sekretorischen Formen des  $\beta$ -TP sichtbar, was auf eine intakte ko- und posttranslationale Prozessierung und eine effiziente Translokalisierung durch die Transportkompartimente in den extrazellulären Raum schließen lässt.

Die Akkumulation des rekombinanten Proteins geht erst mit der Aktivierung der ODV-Phase und dem damit verbundenen Verlust der distinkten Transportkompartimente und der Ablagerung des  $\beta$ -TP in größeren vesikulären Strukturen einher (siehe 3.2.2.). Erst ab Beginn dieser Phase sind intrazellulär die mono- und biglycosylierten Biosyntheseintermediate und die nicht glycosylierten Proteinformen nachweisbar. Die gleichen Ergebnisse, wie sie hier für die Kinetik der Produktbildung des  $\beta$ -TP in High Five Zellen dargelegt wurden, wurden auch bei der Expression des  $\beta$ -TP in Sf21 Insektenzellen erhalten (Abb. 28).



**Abb.28.** Zeitlicher Verlauf der  $\beta$ -TP Produktbildung in Baculovirus-infizierten Sf21 Zellen. Die Zellen einer 100 ml Suspensionskultur wurden in einer 500 ml Spinnerflasche bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  mit einer  $\text{MOI}=3$  infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden  $1 \times 10^6$  Zellen aufgearbeitet und 10 % des Ansatzes auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der Überstand wurde 1:2 mit Probenpuffer aufgetragen und hiervon 2 % auf das Gel gegeben. Insgesamt ergab sich dadurch ein Verhältnis der intrazellulären Fraktionen (IZ) zu den extrazellulären Fraktionen (EZ) von 5:1. Als Standard diente ein aus infizierten High Five Zellen aufgereinigtes rekombinantes  $\beta$ -TP.

**Zusammenfassung:**

Durch die Western Blot Analyse aufgenommenen Kinetiken der Produktbildung des  $\beta$ -TP in beiden Zelllinien zeigt sich sehr deutlich, daß zu Beginn der Produktexpression während der Übergangsphase keine Störungen bei der geregelten Prozessierung und dem Transport der neu gebildeten Proteinketten vorliegen. Auf dem Western Blot sind intrazellulär lediglich die sekretorische Formen nachweisbar. Mit dem Beginn der ODV-Phase, die mit dem Verlust der distinkten Zellkompartimente einhergeht, akkumulieren die mono- und biglycosylierten Biosyntheseintermediate und die nicht glycosylierten Proteinketten.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte durch radioaktive Markierungen (*pulse-chase* Experimente) der Verlauf der Akkumulation des rekombinanten Modellproteins durch die Untersuchung der Biosynthese bzw. das Sekretionsverhalten der einzelnen Proteinformen des  $\beta$ -TP erfolgen.

**3.3.4.2. Biosynthese und konstitutive Sekretion von  $\beta$ -TP in infizierten Insektenzellen***Etablierung der pulse-chase Experimente*

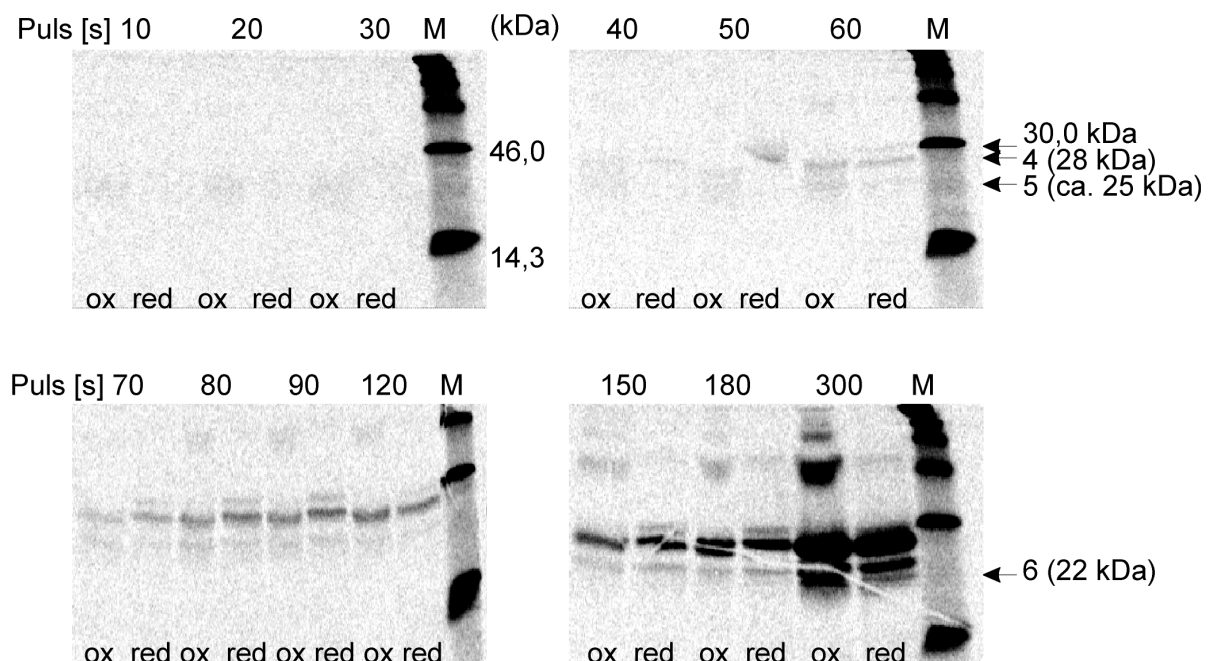
Für die Untersuchung der Verlaufes der Akkumulation des rekombinanten Proteins bzw. des Sekretionsverhaltens wurde ein *pulse-chase* Experiment durchgeführt. Zur radioaktiven Markierung sollte  $^{35}\text{S}$ -Methionin verwendet werden, da in den Zellen gewöhnlich ein sehr geringer endogener Pool an dieser Aminosäure vorhanden ist und daher exogen zugesetztes, radioaktiv markiertes Methionin sehr schnell in die neu synthetisierten Proteinketten eingebaut wird. Bei dem für die Kultivierung der Insektenzellen und Produktexpression verwendeten Medium Excell 401 beträgt der Methioningehalt  $6 \text{ mmol l}^{-1}$ , so daß für eine effektive Markierung ein Methionindefizientes Medium eingesetzt werden muß. Erste Experimente wurden mit dem von

der Firma JRH Bioscience kommerziell erhältlichen, Methionin-defizienten Excell 401 Flüssigmedium durchgeführt. Alternativ kam auch das von der Firma Gibco BRL vertriebene Methionin/Cystein-freie Flüssigmedium SF900II zum Einsatz. In keinem Fall wurde das neu synthetisierte rekombinante Protein trotz guter Produktexpression (Western Blot) effektiv markiert. Eine genauere Untersuchung ergab, daß beide Medien mit einem Methioningehalt von  $600 \mu\text{mol l}^{-1}$ , verursacht durch die weiterhin enthaltene Hefeextraktkomponente, kontaminiert waren. Bei der verwendeten Pulse-Konzentration von  $250 \mu\text{Ci ml}^{-1}$  (spez. Konzentration  $1000 \text{ Ci mmol}^{-1}$ ) entspricht das einer 2500-fach höheren Konzentration an nicht radioaktivem Methionin, so daß die Konzentration der radioaktiven Komponente deutlich zu gering war und fast ausschließlich das nicht markierte Methionin eingebaut wurde. Aus diesem Grund wurde ein an die Bedürfnisse von Insektenzellen angepaßtes Medium hergestellt. Als Basalmedium diente dabei das von der Firma Sigma vertriebene Methionin-defiziente MEM (*minimal essential medium*) mit nicht-essentiellen Aminosäuren und Earle's Salzen. Dieses Medium, ursprünglich für Fibroblasten und HeLa-Zellen entwickelt, wurde an Insektenzellen- spezifische Bedürfnisse von Aminosäuren, Salzen, Fettsäuren, Vitaminen, Osmolarität und pH-Wert angepaßt (siehe 2.2.3.). Bei Wachstums- und Expressionstests zeigte sich, daß sich High Five Zellen trotz hoher Vitalität (ca. 98 %) nicht mehr teilen oder max. einen Zyklus beenden und dann arretieren. Nach Austausch von MEM gegen TEX konnte diese Arretierung wieder aufgehoben werden. Auf die Produktexpression hatte das jedoch keinen Einfluß, so daß für alle weiteren Versuche das modifizierte MEM benutzt wurde. Die Analyse durch SDS-PAGE/Autoradiographie zeigte eindeutig einen effektiven Einbau des radioaktiven Methionins. Ein weiteres Problem bei der Etablierung der *pulse-chase* Strategie stellte die nach dem Zellaufschluß oder aus den Überständen allgemein übliche Immunpräzipitation zur Reinigung des Produktes dar. Durch das verwendete  $\beta$ -TP-Antiserum in Kombination mit an Sepharose-CL4B gekoppeltem Protein-A wurde das rekombinante Protein kaum oder nicht präzipitiert. Vielmehr zeigten sich anhand von SDS-PAGE/Autoradiographie vornehmlich unspezifische Bindungen. Durch

Verwendung von kleinen Affinitätssäulen wie unter 2.9. beschrieben konnte dieses Problem gelöst werden.

#### *Biosynthese und konstitutive Sekretion von $\beta$ -TP in infizierten Insektenzellen*

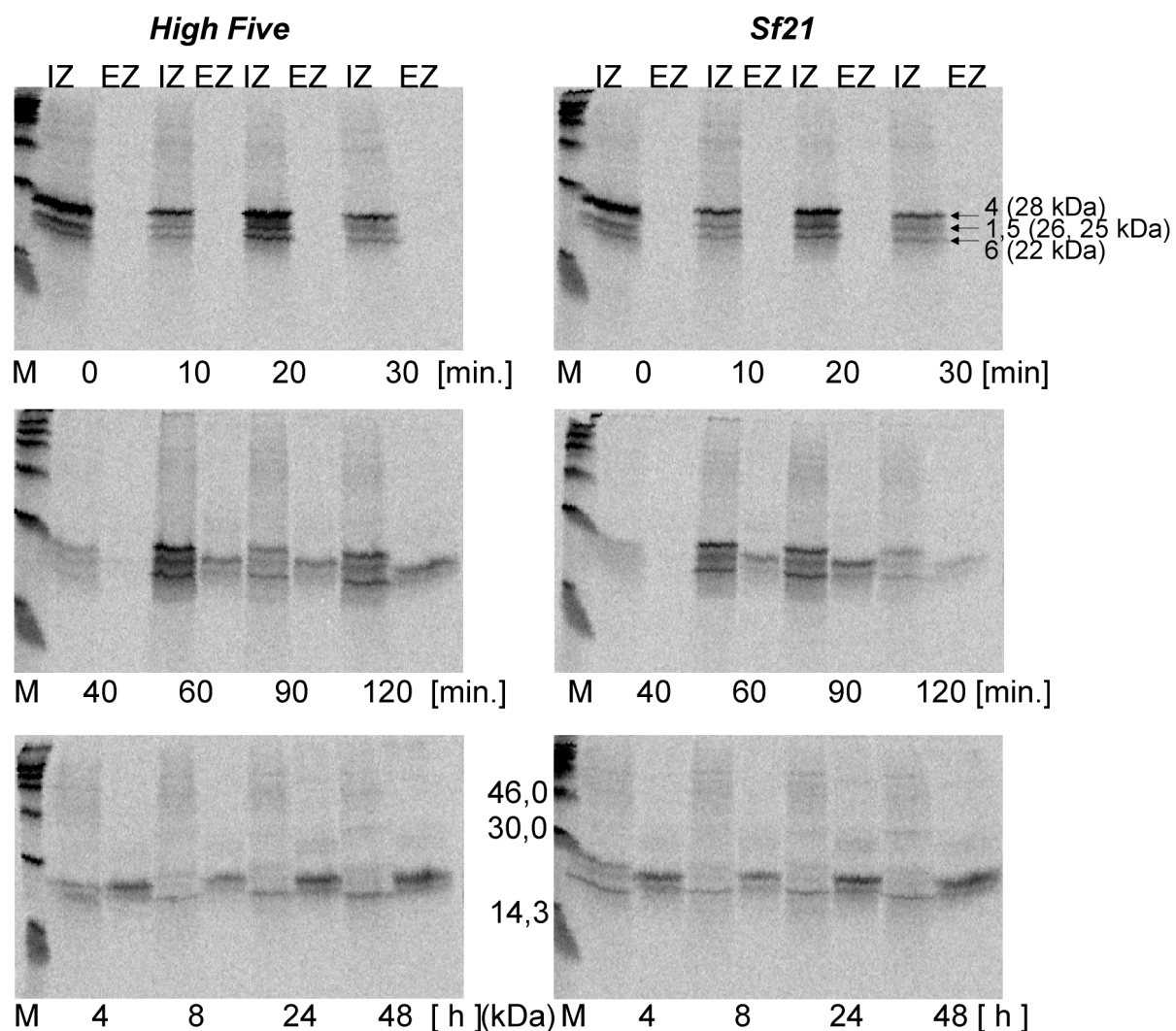
Um die ersten Schritte der Proteinbiosynthese in Baculovirus-infizierten Insektenzellen zu untersuchen und um eine optimale Markierungszeit für ein anschließendes *pulse-chase* Experiment zu erhalten, erfolgte zunächst ein *pulse* Experiment. Dazu wurden  $2 \times 10^6$  High Five Zellen in 6-Lochplatten mit einer MOI=5 infiziert. Nach 48 h erfolgte dann für jeweils eine kurze Zeit ein Puls mit 250  $\mu$ Ci  $^{35}$ S-Methionin. Nach der entsprechenden Markierungszeit wurde das Medium sofort entfernt, der Lysatpuffer, der zusätzlich zu den Proteaseinhibitoren 20 mM Iodacetedamid und 100 mM Cycloheximid enthielt, zugegeben und die Zellen wie unter 2.4.5. beschrieben, aufgearbeitet. 50 % der aufgereinigten Proteinmengen wurden im SDS-Gel getrennt und durch Autoradiographie analysiert (Abb.29).



**Abb.29.** Autoradiographie nach verschiedenen Pulszeiten mit 250  $\mu$ Ci  $^{35}$ S-Methionin. Die mit dem AcMNPV- $\beta$ TP infizierten High Five Zellen wurden nach 48 h über verschiedene Zeiten mit  $^{35}$ S-Methionin markiert, das intrazelluläre  $\beta$ -TP aufgearbeitet, 50 % des Ansatzes über SDS-PAGE getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. ox, oxidiert (-DTT); red, reduziert (+DTT); M, Molekulargewichtsmarker  $^{14}$ C-markiert.

Unter den gewählten Bedingungen läßt sich der zeitliche Verlauf der Bildung des  $\beta$ -TP sehr gut erkennen. So ist zunächst das rekombinante  $\beta$ -TP bis zu einem Puls von 40 s nur als diffuser Hintergrund sichtbar. Die ersten Proteinketten erscheinen nach 50 s als Doppelbande bei 30 und 28 kDa, wobei die zweite Bande das zuvor charakterisierte biglycosylierte Biosyntheseintermediat (Bande 4, 28 kDa, siehe Abb.26) repräsentiert. Dieses Intermediat ist im Vergleich zu der Proteinform mit dem apparenten Molekulargewicht von 30 kDa in weitaus größeren Mengen vorhanden. Beide Proteinformen laufen unter oxidierten Bedingungen mit einem niedrigeren apparenten Molekulargewicht, was auf die Existenz von intramolekularen Disulfidbrücken hinweist. Wie aus der Analyse des intrazellulären  $\beta$ -TP ebenfalls hervorgeht, handelt es sich bei der Proteinform der Bande 4 um ein schon prozessiertes Glycoprotein-syntheseintermediat (siehe 3.3.2.). Die Proteinform bei 30 kDa repräsentiert wahrscheinlich aufgrund des etwas höheren apparenten Molekulargewichts das biglycosylierte *en bloc* Transferintermediat  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ . Neben diesen beiden Formen erscheint ab 60 s auch eine weitere im Vergleich zur Bande 4 sehr schwache Bande zwischen 25 und 26 kDa, die wie die beiden anderen Proteinformen intramolekulare Disulfidbrücken aufweist. Diese Proteinform entspricht sehr wahrscheinlich der zuvor beschriebenen Banden 5 (Abb. 26) und repräsentiert damit das monoglycosylierte Biosyntheseintermediat, da es sehr unwahrscheinlich ist, daß zu diesem Zeitpunkt schon signifikante Mengen in die sekretorische Form (Bande 1) des  $\beta$ -TP überführt worden sind. Diese drei Proteinformen weisen bis zu einem Puls von 150 s ein konstantes Verhältnis über die Zeit auf, so daß sich lediglich die Gesamtmenge erhöht. Noch weitaus geringer und erst ab einer Pulszeit von 300 s sind die nicht glycosylierten Proteinketten ohne Disulfidverbrückungen sichtbar. Damit zeigt sich eindeutig, daß diese Proteinformen im Vergleich zu dem biglycosylierten Intermediaten nur wenig gebildet werden, was scheinbar im Widerspruch zu Ergebnissen der Produktbildungskinetik steht (siehe 3.3.4.1.), nach denen die Hauptproteinformen (Banden 4-6) in gleichen Mengen vorliegen. Der Grund für diese Diskrepanz könnte darin begründet sein, daß die Glycosylierungsintermediate im

Verlauf der Expression prozessiert und sekretiert werden, während die nicht glycosylierten Proteinformen (ohne Disulfidbrücken) in den Zellen abgelagert werden und sich konzentrieren. Diese Hypothese kann nur durch ein *pulse-chase* Experiment bestätigt werden, wie im folgendem durchgeführt. Für das Experiment wurden High Five- und Sf21 Zellen 28 h nach der Infektion markiert und wie unter 2.4.5. beschrieben aufgearbeitet. Wie Abb. 30 zeigt wird die biglycosylierte, sekretorische



**Abb.30.** Autoradiographie nach Affinitätsreinigung der intrazellulären (IZ)- und extrazellulären (EZ) Formen des  $\beta$ -TP nach einem pulse von 5 min. Die mit rekombinanten Baculoviren infizierten High Five Zellen wurden 28 h nach der Infektion 5 min mit 250  $\mu$ Ci  $^{35}$ S-Methionin markiert, dann wurde das Medium gegen frisches TEX ersetzt. Nach verschiedenen Zeitspannen (chase) wurde jeweils der Inhalt eines Lochs der 6-Lochplatte (Überstand und Zellen) aufgearbeitet, affinitätsgereinigt und durch SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie analysiert. Aufgetragen wurden 40 % des Ansatzes, was 8  $\times 10^5$  Zellen entspricht. IZ, intrazellulär; EZ, extrazellulär

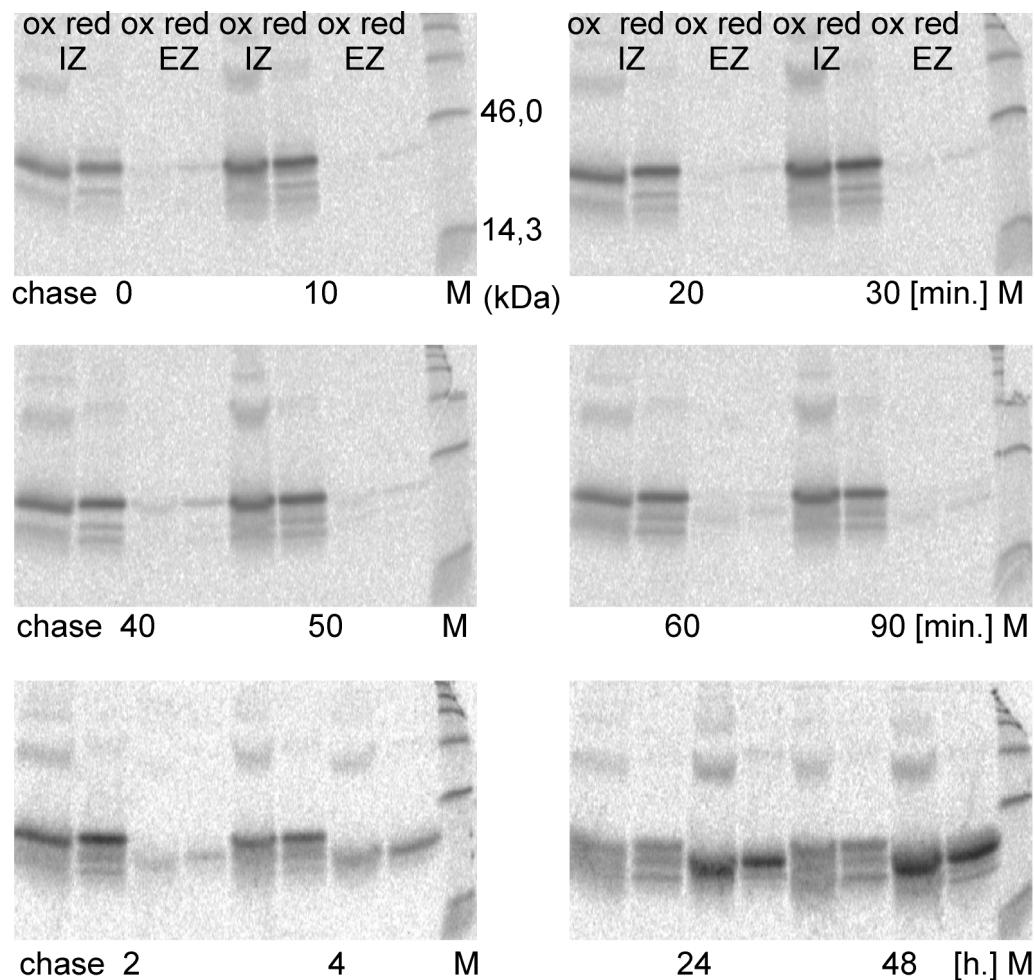


Form des  $\beta$ -TP in beiden Zelllinien nach 60 min *chase* im Medium detektiert. Die Intensität dieser Bande nimmt kontinuierlich bis 4h *chase* zu. Während zu diesem Zeitpunkt in Sf21 Zellen das biglycosylierte Biosyntheseintermediat (Bande 4, 28 kDa) noch intrazellulär zu erkennen ist, ist dieses Intermediat in High Five Zellen schon in die biglycosylierte sekretorische Form (Bande 1, 26 kDa) überführt. Zur vollständigen Sekretion benötigen die glycosylierten Spezies in beiden Fällen unter den gewählten Bedingungen ungefähr 8 h, während die nicht glycosylierten Proteinformen über den gesamten Zeitraum bis 48 h *chase* mit den Zellen assoziiert bleiben. So konzentrieren sich diese Formen im Vergleich zu den glycosylierten Proteinformen viel stärker auf und machen am Ende der Produktexpression einen Anteil von ca. 15 % am insgesamt gebildeten  $\beta$ -TP aus. Damit bestätigt sich die Hypothese, daß die Glycosylierungsintermediate im Verlauf der Expression prozessiert und sekretiert werden, während die nicht glycosylierten Proteinformen (ohne Disulfidbrücken) in den Zellen abgelagert werden und sich konzentrieren.

Die Proteinbiosynthese des biglycosylierten  $\beta$ -TP verläuft wie gezeigt über das nichtprozessierte Glycosylierungsintermediat mit der apparenten Masse von 30 kDa ( $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , Abb. 29), das schon prozessierte oligomannosidische Intermediat (Bande 4, 28kDa) und die reife sekretorische Form (Bande 1, 26 kDa), wobei die erste Proteinform kein stabiles Intermediat darstellt und schnell in die oligomannosidische Form (Bande 4) überführt wird. Die Proteinformen (Bande 4 und 1) sind aber über längere Zeit stabil mit den Zellen assoziiert, wobei die reife sekretorische Form (Bande 1) ab 60 min *chase* detektiert wird. Die Unterscheidung zwischen der reifen sekretorischen Form (Bande 1) und dem monoglycosylierten Glycosylierungsintermediat (Bande 5) ist aufgrund eines sehr ähnlichen apparenten Molekulargewichtes nur schwer möglich. Beide Varianten liegen wahrscheinlich ab 60 min *chase* nebeneinander vor.

Im Zuge dieser Untersuchungen war es weiterhin interessant zu untersuchen, ob sich im Verlauf der Infektion die Sekretionseigenschaften des  $\beta$ -TP ändern. Denn wie in den elektronenmikroskopischen Experimenten gezeigt, akkumuliert das rekombinante

Modellprotein im weiteren Infektionsverlauf in großen vesikulären Ablagerungen. Aus diesem Grund wurde ein weiteres *pulse-chase* Experiment mit High Five Zellen zu einem späteren Zeitpunkt nach 48 h wie zuvor beschrieben durchgeführt (Abb. 31). Auch hier wird das konstitutiv sekretorische Protein nach 50-60 min. *chase* erstmals im Medium detektiert und reichert sich im weiteren Verlauf an. Im Gegensatz zum



**Abb.31.** Autoradiographie nach Affinitätsreinigung der intrazellulären (IZ)- und extrazellulären (EZ) Formen des  $\beta$ -TP nach einem pulse von 5 min. Die mit rekombinanten Baculoviren infizierten High Five Zellen wurden 48 h nach der Infektion 5 min mit 250  $\mu$ Ci  $^{35}$ S-Methionin markiert, dann wurde das Medium gegen frisches TEX ersetzt. Nach verschiedenen Zeitspannen (*chase*) wurde jeweils der Inhalt eines Lochs der 6-Lochplatte (Überstand und Zellen) aufgearbeitet, affinitätsgereinigt und durch SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie analysiert. Aufgetragen wurden 40 % des Ansatzes, was 8  $\times 10^5$  Zellen entspricht. IZ, intrazellulär; EZ, extrazellulär; ox, -DTT; red, +DTT

vorhergehenden Experiment zeigt sich, daß zum Zeitpunkt 4 h *chase* die glycosylierten Vorläufer kaum prozessiert sind und noch ca. 80 % des gebildeten rekombinanten Proteins mit den Zellen assoziiert sind. Die Glycosylierungsintermediate werden nur sehr langsam prozessiert, so daß sich die relativen Verhältnisse der einzelnen Banden erst ab 24 h *chase* ändern. So sind nach 24 h noch 55 % intrazellulär vorhanden und selbst nach 48 h (96 h p.i.) bleiben noch 35 % mit den Zellen assoziiert (Abb.31). Das Ergebnis beweist demnach eindeutig einen Zusammenhang von Infektionszeitpunkt, Prozessierung und Sekretion. Mit zunehmender Infektionszeit scheinen damit die Glycosylierungsintermediate immer langsamer prozessiert zu werden.

### **Zusammenfassung**

In einem *pulse* Experiment nach 28 h p.i. konnte gezeigt werden, daß vor allem das biglycosylierte Glycosylierungsintermediat mit intramolekularen Disulfidbrücken (Bande 4, Abb. 26) gebildet wird. Daneben wird weniger stark auch das monoglycosylierte Intermediat (auch mit intramolekularen Disulfidbrücken) synthetisiert. Diese Proteinformen weisen bis zu einem Puls von 150 s ein konstantes Verhältnis auf, so daß sich lediglich die Gesamtmenge erhöht. Insgesamt zeigen die *pulse* und *pulse-chase* Experimente, daß sich in einem gegebenen Zeitintervall die Akkumulation des rekombinanten Proteins in einer langsamen Prozessierung der Glycosylierungsintermediate ausdrückt, wobei sich dieses Problem im Verlauf der Infektion verstärkt. Daneben werden sehr marginal nicht glycosylierte Proteinketten ohne Disulfidbrücken gebildet. Da sie aber nicht weiter prozessiert und in den Zellen abgelagert werden, kommt es über den gesamten Infektionsverlauf gesehen zur starken Anreicherung dieser Proteinformen in den Zellen. Der prozentuale Anteil dieser Proteinformen an dem gesamt gebildeten  $\beta$ -TP beträgt so am Ende der Produktexpression ca. 15 %.

### 3.4. Analyse der ko- und posttranslationalen Modifikationen des intra- und extrazellulären $\beta$ -TP aus infizierten Insektenzellen

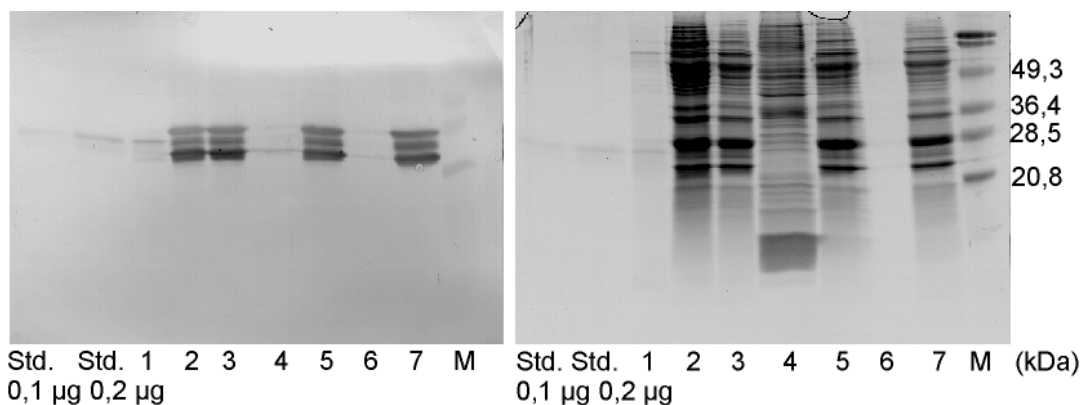
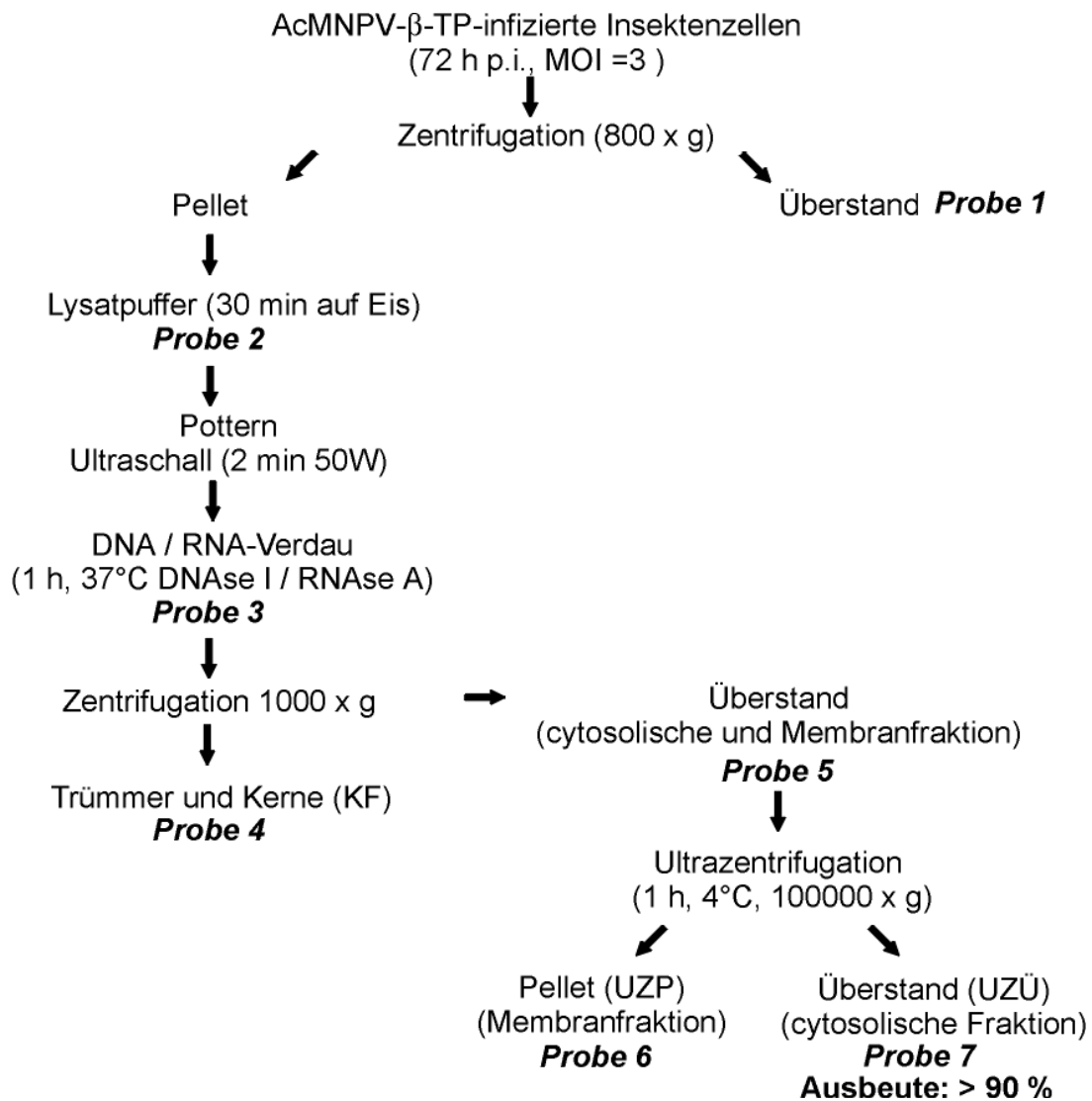
Wie durch die immunhistochemischen Untersuchungen (3.2.) und die biochemische Charakterisierung der Biosynthese des  $\beta$ -TP in infizierten Insektenzellen (3.3) klar wurde, ist das Problem der Akkumulation des  $\beta$ -TP in infizierten Insektenzellen eng an den Lebenszyklus des Baculovirus gebunden. Im Verlauf der Produktexpression des rekombinanten Modellproteins entstehen dabei drei Hauptformen, zwei glycosylierte Biosyntheseintermediate mit intramolekulare Disulfidbrücken (Abb. 26, Bande 4, 5) und eine nicht glycosylierte Proteinform ohne Disulfidbrücken (Abb. 26, Bande 6). Mit den dort angewendeten indirekten Methoden waren aber bisher keine präzisen Aussagen hinsichtlich der Ausführung der ko- und posttranslationalen Modifikationen möglich. Es konnte lediglich festgestellt werden, ob eine entsprechende Proteinform z.B. durch N-Glycane modifiziert wurde oder nicht. Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

- S    Werden die Signalpeptide der synthetisierten Proteine von den Signalpeptidasen korrekt abgespalten?
- S    Welche Oligosaccharidstrukturen des  $\beta$ -TP existieren intrazellulär? Gibt es ungewöhnliche Oligosaccharidstrukturen?
- S    Welche intramolekularen Disulfidbrücken bilden die intrazellulären Intermediate aus? Gibt es Unterschiede zwischen den intrazellulären Intermediaten und dem extrazellulären  $\beta$ -TP hinsichtlich der Disulfidbrücken? Bildet das rekombinante Protein gemischte Disulfide und/oder liegen einzelne oder mehrere Thiole des  $\beta$ -TP in verschiedenen Oxidationsstufen vor?
- S    Kann anhand der Detektion von Unterschieden bezüglich ko- und/oder posttranslationaler Modifikationen zwischen dem intrazellulären und dem sekretorischen  $\beta$ -TP auf spezielle Engpässe des Sekretionsweges geschlossen werden, die durch *metabolic engineering* Ansätze unterbunden werden können?

Die Beantwortung dieser Fragestellungen ist nur durch die detaillierte Analyse der ko- und posttranslationalen Modifikationen mit komplementären chromatographischen und massenspektrometrischen *mapping*-Verfahren (HPAEC-PAD, MALDI/TOF-MS, ESI-MS, ESI-MS-MS) und durch N-terminale Sequenzanalyse möglich. Eine Vorbedingung dafür stellt die quantitative Reinigung der intrazellulären Proteinformen des  $\beta$ -TP dar.

#### 3.4.1. Reinigung des intrazellulären $\beta$ -TP aus infizierten Insektenzellen

Wie unter 1.5. (Herstellung rekombinanter Proteine mit dem Baculovirus Expressionssystem) beschrieben, soll es sich bei den intrazellulär akkumulierten Proteinformen in infizierten Insektenzellen um unlösliche Ablagerungen handeln, die vergleichbar mit *inclusion bodies* in *E. coli* sind. So ist es bisher keiner Arbeitsgruppe gelungen das jeweilig exprimierte intrazelluläre Modellprotein zu reinigen. Es konnte lediglich partiell durch das Lösen mit Guanidinhydrochlorid (GuHCl) (Xie et al., 1992) oder die Koexpression mit dem Chaperon BiP (Hsu et al., 1997) gereinigt werden, wodurch keine repräsentativen Aussagen möglich waren. Für die nachfolgende Analytik war es deshalb unbedingt erforderlich, das intrazellulär mit den Zellen assoziierte Protein quantitativ zu reinigen. Die Expression des  $\beta$ -TP erfolgte jeweils in einer 100 ml Suspensionskultur von High Five Zellen bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  und einer MOI=3 in einer 500 ml Spinnerflasche. Da eine möglichst hohe Ausbeute an rekombinantem Protein erzielt werden sollte und dabei möglichst wenig intrazelluläre Aggregate durch die einsetzende Zellyse in den Überstand gelangen sollten, erfolgte die Aufarbeitung der Zellen 72 h p.i.. Am wirkungsvollsten für den Zellaufschluß erwies sich eine Kombination aus osmotischer Lyse mit Detergenzienbehandlung (siehe 2.6.) auf Eis für 30 min mit anschließendem Pottorn und zweiminütiger Ultraschallbehandlung. Weiter zeigte sich, daß vor der Fraktionierung der Zellbestandteile durch Ultrazentrifugation der Verdau der freigesetzten DNA und RNA erforderlich war. Die Qualität der Reinigung wurde durch verschiedene Probenahmen an entsprechenden Stellen des Prozesses durch SDS-PAGE/*western blotting* verifiziert (Abb.32).



**Abb.32.** Strategie und Verifizierung der Reinigung des intrazellulären  $\beta$ -TP aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen. Fließschema (oben), Western Blot (links) und SDS-PAGE (rechts) der entsprechenden Fraktionen. Die Fraktionen 2-7 sind im Vergleich zur Fraktion 1 um den Faktor 5 konzentriert. Std, Standard  $\beta$ -TP (rekombinant) aus High Five Zellen. M, Molekulargewichtsmarker

Die Expressionsrate des konstitutiv sekretorischen Proteins lag zwischen 100-200 mg l<sup>-1</sup> (Quantifizierung erfolgte durch Schätzung der Konzentrationen auf dem Western Blot). Sowohl Western Blot als auch SDS-PAGE zeigen deutlich, daß die Isolierung des intrazellulären Proteins quantitativ ist und über die einzelnen Reinigungs- bzw. Aufarbeitungsschritte auch kein Protein proteolytischen Abbauprozessen unterliegt bzw. verloren geht. Die Trennung in Kern-, Membran- und cytosolische Fraktion ergab, daß sich die absolute Majorität des rekombinanten Proteins in löslicher Form in der cytosolischen Fraktion befindet (Ausbeute >90 %). Somit kann hier bei Verwendung dieses Modellproteins nicht bestätigt werden, daß es sich um denaturierte, unlösliche Ablagerungen handelt. Diese Aufarbeitungsprozedur wurde auch mit Baculovirus-infizierten Sf21 Zellen durchgeführt und ergab die gleichen Ergebnisse (nicht gezeigt).

Nach Verdünnung dieser cytosolischen Fraktion mit PBS im Verhältnis 1:2 konnte das rekombinante Protein in einem Einschrittverfahren durch Affinitätschromatographie gereinigt werden. Für alle nachfolgenden physikochemischen Feinstrukturanalysen wurde diese cytosolische Fraktion entsprechend generiert und weiterverarbeitet.

### **Zusammenfassung**

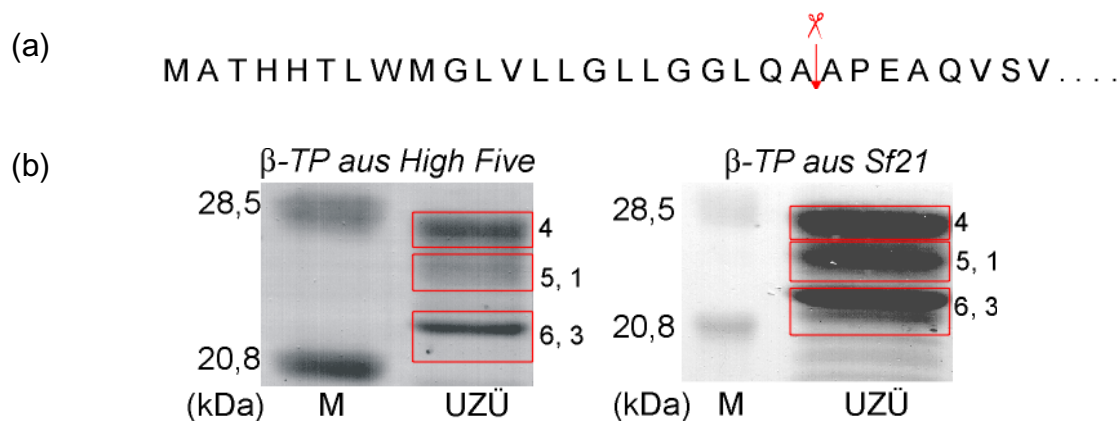
Mit der etablierten Reinigungsstrategie ist eine Vorbedingung erfüllt, die es erlaubt, die intrazellulären Proteinformen des  $\beta$ -TP hinsichtlich posttranslationaler Modifikationen wie Signalpeptidabspaltung, Proteinglycosylierung und Disulfidbrückenbildung detailliert zu untersuchen.

#### **3.4.2. Signalpeptidabspaltung**

Eine der ersten Schritte der Proteinbiosynthese von sekretorischen Proteinen und Membranproteinen beinhaltet die korrekte Abspaltung der Signalpeptide. Um zu überprüfen, ob bei den intrazellulären Proteinformen des  $\beta$ -TP eine korrekte N-terminale Signalpeptidabspaltung stattgefunden hat, wurden, wie zuvor beschrieben, die cytosolische Fraktion (UZÜ) aus infizierten High Five und Sf21 Zellen isoliert und

gelchromatographisch aufgetrennt (siehe 2.8.). Die intrazellulären Proteinformen des  $\beta$ -TP wurde dann elektrophoretisch getrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und der N-terminalen Aminosäuresequenzierung unterworfen.

Die Aminosäuresequenzanalyse der einzelnen Banden des intrazellulären  $\beta$ -TP ergab, daß in High Five Zellen das Signalpeptid des bi- und monoglycosylierten Biosyntheseintermediates (Banden 4 und 5) und der biglycosylierten sekretorischen Form des  $\beta$ -TP (Banden 1) zu 100 % korrekt abgespalten wurde (Abb.33 b, c). Alle Proteinformen weisen demnach den intakten N-Terminus APEAQ auf (Abb. 33a).



(c) N-Terminale Sequenzierung der intrazellulären  $\beta$ -TP-Formen aus infizierten Insektenzellen.

Banden Nr.	<b>High Five</b>		<b>Sf21</b>	
	Häufigkeit (%)		Häufigkeit (%)	
	APEAQ / AAPEAQ		APEAQ / AAPEAQ	
4 (28 kDa)	100/0		100/0	
5, 1 (25, 26 kDa)	100/0		100/0	
6, 3 (22, 21 kDa)	5 / 95		15 / 85	

**Abb.33.** Signalpeptidabspaltung des rekombinanten  $\beta$ -TP aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen. (a) Prosequenz des  $\beta$ -TP mit Signalpeptid und den ersten Aminosäuren der reifen Sequenz. Der Pfeil kennzeichnet die Schnittstelle der Signalpeptidase der sekretorischen Formen des  $\beta$ -TP. (b) Western Blot nach Coomassie R250-Färbung der über Gelpermeationschromatographie gereinigten UZÜ-Fraktion. Die einzelnen Kästen markieren die ausgeschnittenen Banden, die dann N-terminal sequenziert wurden. In den mittleren Kästen ist die monoglycosylierte sekretorische Form des  $\beta$ -TP (Bande 2, Abb. 26) auch enthalten. Da sie aber jeweils in sehr geringen Mengen vorliegt, kann diese Proteinform auf dem Blot durch Coomassie-Färbung nicht sichtbar gemacht werden (c) Zusammenfassung der Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung. Die Numerierung der Banden wurde aus der Charakterisierung des intrazellulären Bandenmusters des  $\beta$ -TP übernommen (siehe Abb.26).



Bei den Banden 3 und 6, die die nicht glycosylierten Proteinformen ohne Disulfidbrücken repräsentieren, sind hingegen aus High Five Zellen 95 % und aus Sf21 Zellen 85 % der Proteinketten um ein A N-terminal verlängert, so daß sich der N-Terminus AAPREAQ ergibt. Um zu überprüfen, ob eine Spaltung in der Prosequenz zwischen Q und A möglich ist, die dann letztendlich zur Kettenverlängerung um ein A führt, wurde die -1, -3 - Regel (von Heijne 1983, siehe 1.6.1.) auf beide detektierte Schnittstellen angewandt. Die Ergebnisse sind in Tab.4 zusammengefaßt.

**Tab.4** Analyse der Spaltstellen der intrazellulären Formen des  $\beta$ -TP aus Insektenzellen durch die Signalpeptidase.

normale Schnittstelle: LQA-APE			andere Schnittstelle: GLQ-AAP		
Pos.	AS	Beurteilung der Aminosäure an dieser Position	AS	Beurteilung der Aminosäure an dieser Position	
-6	L	ok	L	ok	
-5	G	ok	L	sehr selten	
-4	G	ok	G	ok	
-3	L	ok	G	sehr selten	
-2	Q	ok	L	nein	
-1	A	ok	Q	nein	
+1	A	ok	A	ok	

Wie anhand der Tabelle 4 deutlich zu erkennen ist, handelt es sich bei der normalen Schnittstelle um eine nach der -1, -3-Regel korrekte Spaltstelle. An keiner Position von -6 bis +1 treten ungewöhnliche oder nach der Regel unzulässige Aminosäuren auf. Bei der anderen Spaltstelle hingegen weisen gerade die für die Bindung in die Tasche der Protease essentiellen Positionen -1 und -3 geladene (Q) bzw. die Sekundärstrukturbrechende Aminosäuren (G) auf, die eine Bindung in die Tasche der Protease unterbinden und demzufolge die Spaltung zwischen Q und A verhindern sollten. Trotzdem scheint es aber dennoch zu dieser fehlerhaften Spaltung des Signalpeptides zu kommen. Wie in *pulse* und *pulse-chase* Experimenten gezeigt werden konnte, werden diese Strukturen in einem gegebenen Zeitintervall im Vergleich zu den anderen detektierten Biosyntheseintermediaten nur sehr wenig gebildet (siehe 3.3.4.2). Da sie aber in den Zellen abgelagert werden konzentrieren sie sich auf, so daß am Ende der

Produktionsphase ca. 15 % der gebildeten rekombinanten Proteinformen einen um ein A verlängerten N-Terminus aufweisen (geschätzt durch Western Blot Analyse). Daraus folgt, daß die Abspaltung der Signalpeptide generell korrekt und sehr effizient verläuft.

### **Zusammenfassung**

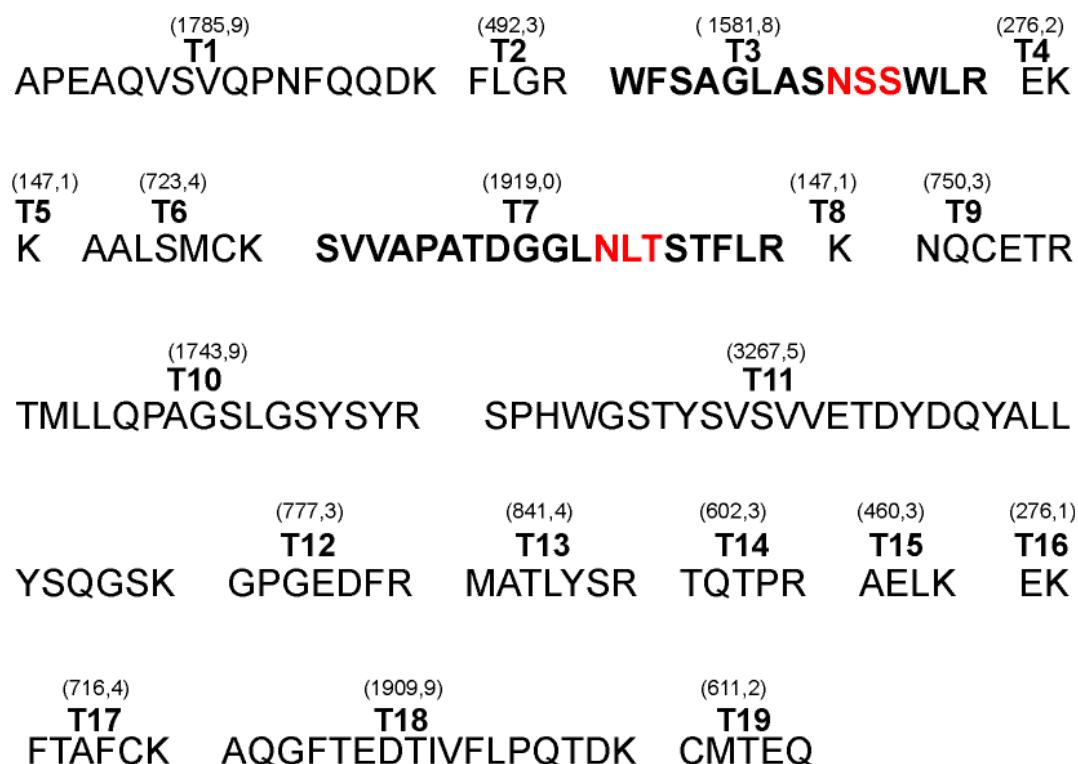
Bei den glycosylierten Proteinformen des  $\beta$ -TP werden die Signalpeptide korrekt erkannt und von der Signalpeptidase abgespalten.

Die nicht glycosylierten Proteinformen (ohne intramolekulare Disulfidbrücken) weisen fast ausschließlich einen um ein A verlängerten N-Terminus auf. In einem gegebenen Zeitintervall werden diese Proteinformen aber nur sehr wenig gebildet.

Generell verläuft die Abspaltung der Signalpeptide korrekt und sehr effizient.

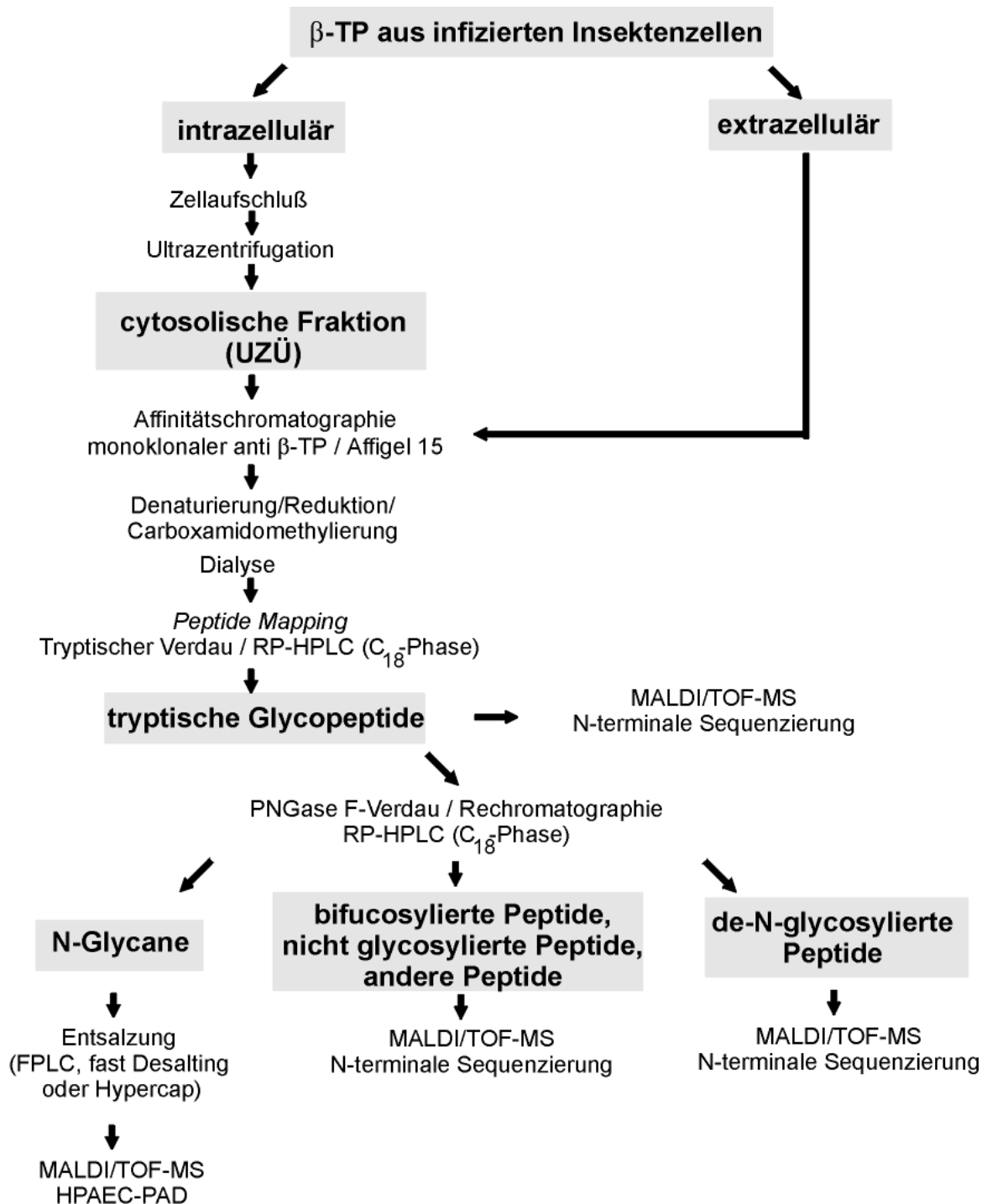
#### **3.4.3. Strategie, Isolierung und Charakterisierung der N-Glycane des $\beta$ -TP in Baculovirus-infizierten Insektenzellen**

Die Reinigung des intrazellulären Proteins erfolgte wie unter 3.4.1. beschrieben. Für die Isolierung der N-Glycane des rekombinanten Modellproteins ist der Verdau mit PNGase F in diesem Falle nicht durchführbar, da das Enzym aus sterischen Gründen die Oligosaccharide nicht effizient abspalten kann und so einen partiellen Verdau bewirkt (pers. Mitteilung H.S.Conradt, GBF, Braunschweig). Aus diesem Grund wurde das  $\beta$ -TP zunächst einem Trypsinverdau unterworfen und eine *Peptide Map* durch RP-HPLC an einer  $C_{18}$ -Phase erstellt. Das für das  $\beta$ -TP generierte tryptische *Peptide Map* ist in Abb. 34 dargestellt. Wie daraus ersichtlich betragen die berechneten monoisotopischen Massen für die „nackten“ Glycopeptide 1581,7 für das erste tryptische Glycopeptid (T3) bzw. 1919,0 für das zweite (T7). Die monoisotopischen Massen der Glycopeptide, die mit N-Glycanen modifiziert sind, sind im Anhang I abgebildet. Die so isolierten Glycopeptide können anschließend, sofern sie nicht proximal bifucosyliert sind (wie teilweise in High Five Zellen), mit PNGase F de-N-glycosyliert werden. Nach Rechromatographie werden die N-Glycane entsalzt und



**Abb.34.** Tryptisches Peptide Map des Modellproteins  $\beta$ -TP mit den Peptiden T1-19. Die in den Klammern stehenden Zahlen kennzeichnen die monoisotopischen Massen  $[M+H]^+$  der einzelnen tryptischen Peptide. Die beiden Glycopeptide T3 und T7 sind fett gedruckt, wobei die Glycosylierungsstellen rot hervorgehoben sind. Die Massen der beiden Peptide kennzeichnen das nicht glycosylierte Peptid.

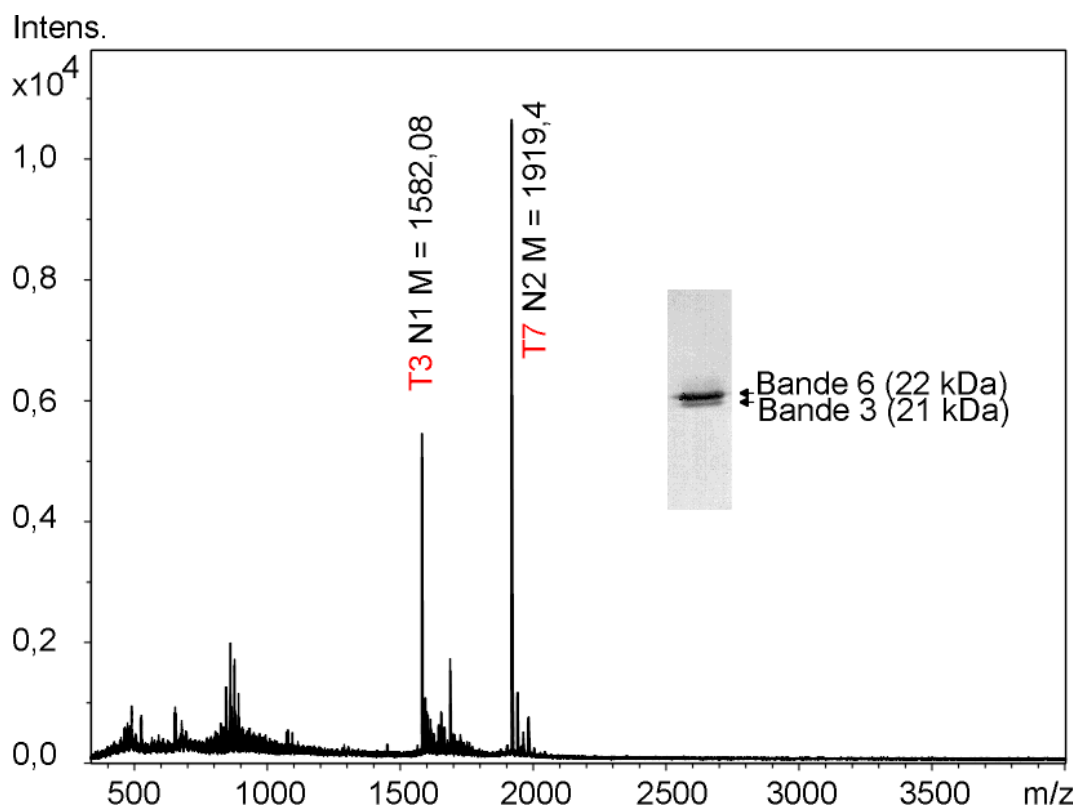
anschließend durch die komplementären Methoden HPAEC-PAD und MALDI/TOF-MS analysiert. Bei den de-N-glycosylierten Peptiden verlängert sich die Retentionszeit bei der Rechromatographie um einige Minuten, da durch die PNGase F das Asparagin (N) in Aspartat (D) überführt wird. Die Identifizierung der Peptide erfolgt über MALDI/TOF-MS und N-terminale Sequenzierung. Zuvor nicht glycosylierte und bifucosylierte Oligosaccharide verändern ihre Retentionszeit nicht und müssen separat, ebenfalls durch MALDI/TOF-MS und N-terminale Sequenzierung untersucht werden. Das Schema für die Isolierung und Feinstrukturanalyse der N-Glycane ist in Abb. 35 zusammengefaßt.



**Abb.35** Strategie der Isolierung und Charakterisierung der N-Glycane des  $\beta$ -TP nach Expression in Baculovirus-infizierten Insektenzellen.

#### 3.4.4. Analyse der nicht glycosylierten Proteinformen

Um die Frage zu beantworten, ob die nicht glycosylierten Proteinformen (Banden 6 und 3, siehe Abb. 26) von dem Glycosylierungsapparat der Zellen glycosyliert, im Verlauf der Infektion aber wieder de-N-glycosyliert werden, erfolgte die Reinigung dieser beiden Proteinformen über die Generierung der cytosolischen Fraktion, an den sich ein Gelpermeationschromatographieschritt anschloß. Die isolierten Proteinformen wurden dann wie zuvor beschrieben weiterverarbeitet und die Peptide T3 und T7 durch MALDI/TOF-MS und Sequenzierung der N-Termini näher untersucht. Die berechneten Massen für die nicht glycosylierten Peptide betragen 1581,7 für das erste tryptische Glycopeptid (T3) bzw. 1919,0 für das zweite (T7) (siehe Abb.34). Das erhaltene Glycopeptidmassenspektrum ist in Abb. 36 dargestellt.

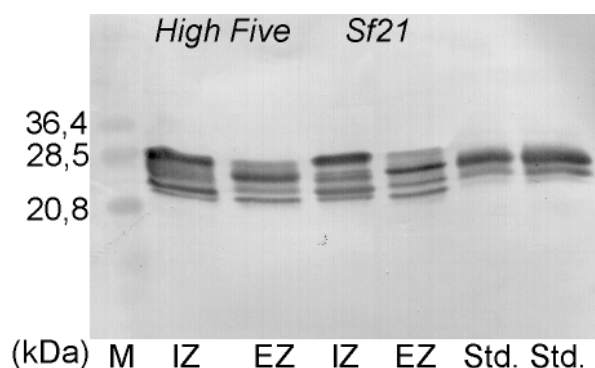


**Abb.36.** MALDI/TOF-MS der tryptischen Glycopeptide der nicht glycosylierten Proteinformen (Banden 6 und 3, siehe Abb. 26). Nach Erstellung des Tryptischen Maps durch RP-HPLC wurden die Glycopeptide gepoolt, eingengt und durch MALDI/TOF-MS analysiert. Das Bild zeigt den Western Blot der isolierten nicht glycosylierten Proteinformen nach Gelpermeationschromatographie der cytosolischen Fraktion (UZÜ).

Anhand der detektierten Massen der einzelnen Peptide läßt sich noch einmal eindeutig feststellen, daß es sich bei den untersuchten Proteinketten um nicht glycosylierte Formen des  $\beta$ -TP handelt. In dem gesamten Spektrum sind lediglich im Grundrauschen einige N-Glycanstrukturen detektierbar. Eine in den Zellen erfolgte de-N-Glycosylierung durch zelluläre PNGasen kann zweifelsfrei ausgeschlossen werden, da dadurch an der N-Glycosylierungsstelle das N in ein D überführt würde, was sich in der Zunahme der Masse um eine Einheit ausdrücken würde. Die Massenspektrometrie ist sensitiv genug, um zwischen diesen beiden Formen (N und D) unterscheiden zu können. Durch N-terminale Sequenzanalyse konnte dieses Ergebnis bestätigt werden.

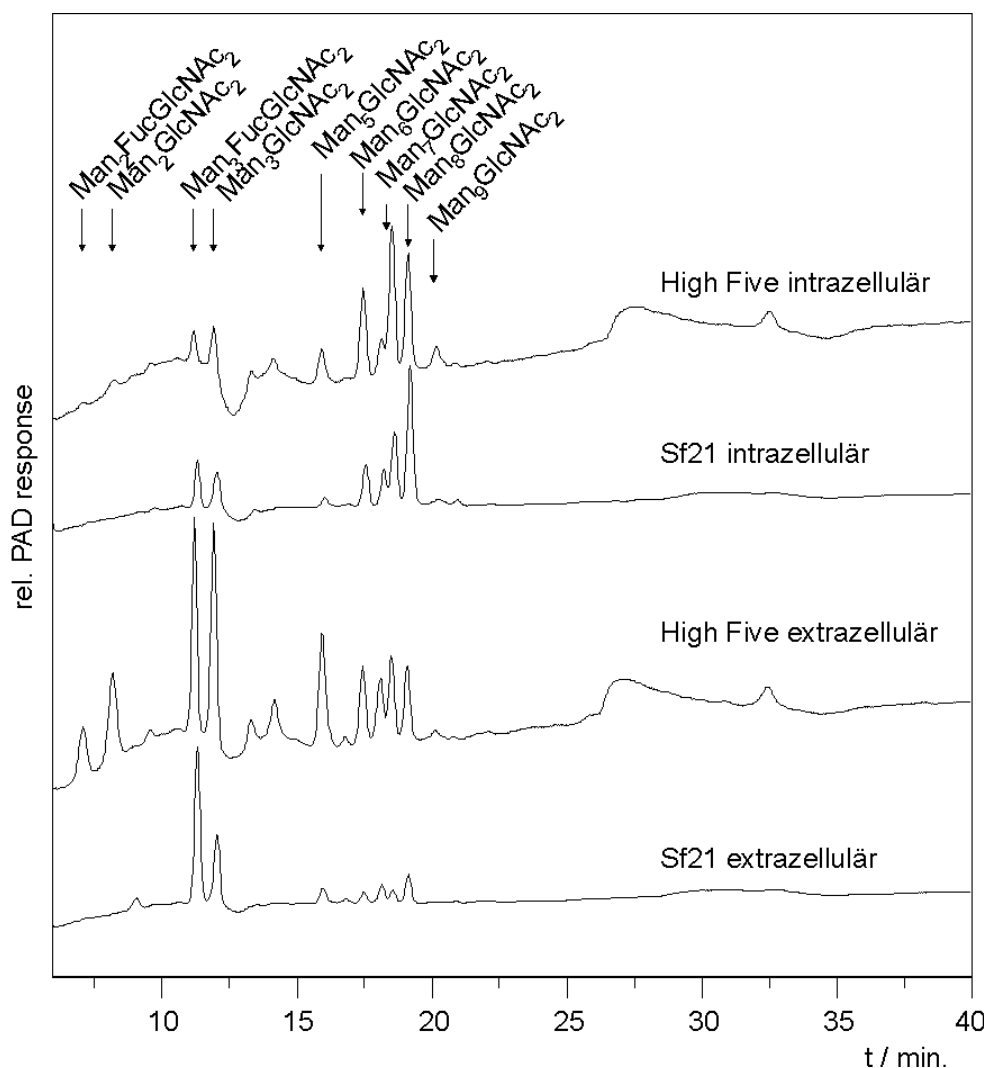
#### 3.4.5. N-Glycane des $\beta$ -TP aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen

Um zu prüfen, ob es Unterschiede bezüglich des N-Glycanmusters zwischen den intra- und extrazellulären Formen des  $\beta$ -TP gibt bzw. ob die intrazellulären Intermediate ungewöhnliche N-Glycanstrukturen besitzen, wurde eine detaillierte Analyse der N-Glycanstrukturen durchgeführt. Wie in der Einleitung (1.6.3.) diskutiert sind die meisten Lepidopteren nur in der Lage paucimannosidische Strukturen ( $\text{Man}_{2-3}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$ ) zu synthetisieren. Für die massenspektrometrische Analyse bedeutet das, daß aufgrund von fast ausschließlich vorkommenden oligomannosidischen und paucimannosidischen Strukturen eine detektierte Hexose (Hex) einer Mannose gleichgesetzt werden kann. Für die Untersuchungen wurden High Five und Sf21 Zellen (100 ml Zellsuspension, Zelldichte von  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) mit einer MOI = 3 infiziert und nach 72 h das intra- und extrazelluläre Protein wie unter 3.4.1. beschrieben, aufgearbeitet. Da zusätzlich eine Disulfidbrückenanalytik durchgeführt werden sollte, erfolgte die Isolierung des  $\beta$ -TP unter Stickstoff (siehe 2.12.). Nach der Konzentrationsabschätzung durch *western blotting* wurde jeweils 1 mg  $\beta$ -TP für die N-Glycan-Analyse verwendet (Abb. 37). Die Isolierung der tryptischen Glycopeptide erfolgte wie in Abb. 35 gezeigt durch RP-HPLC nach Trypsin-Verdau. Ein Teil der jeweiligen Proben wurden durch MALDI/TOF-MS analysiert. Die Massenspektren der Glycopeptide und die Tabellen für die identifizierten N-Glycane und ihrer Glycosylierungsstellen des intra- und



**Abb.37** Konzentrationsbestimmung der nach Affinitätschromatographie gereinigten Proben. Aufgetragen wurden 0,1 % des Ansatzes, so daß sich eine Konzentration von ca. 3 mg ergab. Als Referenz zur Abschätzung der Konzentration diente der Standard (Std.) aus High Five. links, 0,5 µg; rechts, 1,0 µg. Die Aufarbeitung erfolgte für die sich anschließende intramolekulare Disulfidbrückenanalytik unter Stickstoff.

extrazellulären  $\beta$ -TP sind im Anhang II (Abb. A1-A4, Tab. I-IV) abgebildet. Wie aus den einzelnen Abbildungen im Anhang II (Abb. A2, A4 und Tab. II, IV) hervorgeht, handelt es sich extrazellulär bei den Hauptstrukturen um die paucimannosidischen Strukturen  $\text{Man}_{2-3}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  und intrazellulär hauptsächlich um oligomannosidischen Glycane des Typs  $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ . Diese Strukturen machen zusammen einen Anteil von ca. 90 % der Gesamtstrukturen aus. Für die Quantifizierung der Hauptstrukturen wurden die N-Glycane durch PNGase F-Verdau de-N-glycosyliert, durch Rechromatographie isoliert und anschließend ein Aliquot durch HPAEC-PAD analysiert (Abb. 38). Um dabei sicher zu gehen, daß es sich um „echte“ Peaks handelt, wurde ein Teil der isolierten N-Glycane reduziert, permethyliert und dann durch MALDI/TOF-MS analysiert (nicht gezeigt). Ein spezielles Problem ergibt sich dabei naturgemäß durch die in High Five Zellen bekannte  $\alpha 1,3$ - bzw.  $\alpha 1,3$ - und  $\alpha 1,6$ -Bifucosylierung. PNGase F ist bei Vorhandensein dieser Strukturen nicht in der Lage, die Kohlenhydratkette von dem Peptidrückrat abzuspalten. Aus diesem Grund wurden nach dem enzymatischen Verdau und nach Rechromatographie die entsprechenden Strukturen in der Glycopeptidfraktion verifiziert. Die Abschätzung der Mengen der  $\alpha 1,3$ - bzw.  $\alpha 1,3$ - und  $\alpha 1,6$ -bifucosylierten Strukturen erfolgte semiquantitativ anhand der Massenspektren der Glycopeptidfraktionen. Aus der HPAEC-PAD-Analyse ergab sich folgende Zusammensetzung der einzelnen N-Glycane (Tab.5). Wie daraus ersichtlich repräsentiert das extrazelluläre  $\beta$ -TP die für die beiden Zellen typische Glycosylierungskapazität. So sind wie erwartet im wesentlichen paucimannosidische Strukturen vorhanden, die entweder nicht, mit einer oder mit zwei Fucosen proximal fucosyliert sind ( $\text{Man}_{2-3}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$ ). Dabei beträgt der Anteil dieser



**Abb.38.** HPAEC-PAD-Profile der N-Glycane des  $\beta$ -TP aus Insektenzellen. Die Identifizierung der Peaks erfolgte durch Vergleich mit den Retentionszeiten der jeweiligen Standards. Man, Mannose; Fuc, Fucose; GlcNAc, N-Acetylglucosamin.

**Tab.5.** Haupt-N-Glycane des  $\beta$ -TP aus Insektenzellen.

N-Glycan	H5/IZ	H5/EZ	Sf21/IZ	Sf21/EZ
		relative Häufigkeit (%)		
Man <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	id.	11	i.d.	1
Man <sub>2</sub> FucGlcNAc <sub>2</sub>	id.	5,5	i.d.	8
Man <sub>2</sub> Fuc <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	id.	5,5	-	-
Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	6	17	14,5	23
Man <sub>3</sub> FucGlcNAc <sub>2</sub>	5	15	11	45
Man <sub>3</sub> Fuc <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	5	15	-	-
Man <sub>5</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	8	10	3	5
Man <sub>6</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	18	6	12	3
Man <sub>7</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	32	8	20	6
Man <sub>8</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	21	6	38	9
Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	5	1	1,5	i.d.

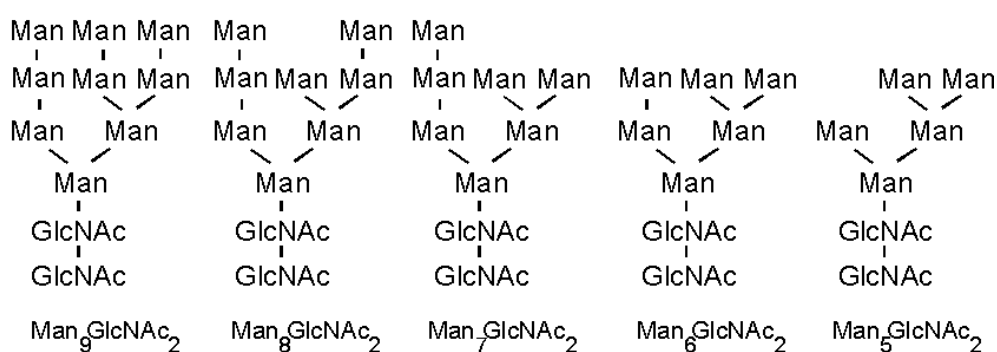
Man, Mannose; Fuc, Fucose; GlcNAc, N-Acetylglucosamin; id., identifiziert



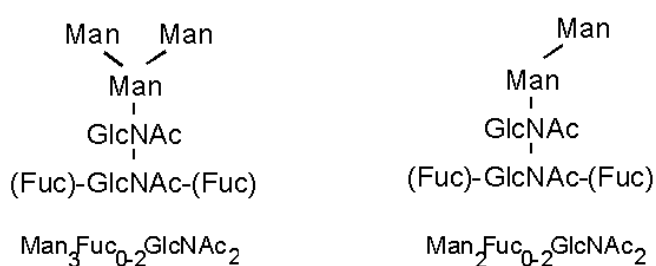
N-Glycane an den Gesamtstrukturen in Sf21 Zellen 77 % und in High Five Zellen 69 %. Das Verhältnis von fucosylierten und nicht fucosylierten Strukturen beträgt annähernd 2 : 1, wobei im Falle der High Five Zellen die  $\alpha 1, 3$ - und  $\alpha 1,6$  bi- und monofucosylierten Strukturen in ungefähr gleichen Mengen vorliegen. Die detektierten *high-mannose-type* N-Glycane ( $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ ) sind vermutlich durch die beginnende Lysis der Zellen in das Medium gelangt und nicht durch konstitutive Sekretion.

Die Daten der Analyse der intrazellulären Glycopeptide (Anhang II, Abb. A1, A3, Tab.I, III) bzw. der N-Glycane durch HPAEC-PAD (Abb. 38) zeigen ein etwas anderes Bild. Hier betragen die Anteile der paucimannosidischen Strukturen 16 % (in High Five Zellen) bzw. 24,5 % (in Sf21 Zellen). Insgesamt sind die intrazellulären Oligosaccharide des  $\beta$ -TP durch *high-mannose-type* Strukturen charakterisiert (84 % in High Five, 74,5 % in Sf21), wobei  $\text{Man}_{7-8}\text{GlcNAc}_2$  die Hauptstrukturen sind. Der Anteil macht in High Five Zellen 53 % und in Sf21 Zellen 58 % der Gesamt-N-Glycane aus. Die ermittelten Haupt-N-Glycanstrukturen sind noch einmal in der folgenden Übersicht zusammengefaßt:

#### intrazellulär



#### extrazellulär



Im Rahmen dieser Arbeit sollte weiter sorgfältig überprüft werden, ob N-Glycane des  $\beta$ -TP mit *complex-type* Strukturen bzw. Oligosaccharidstrukturen mit terminalen N-Acetylglucosaminen (GlcNAc), terminaler Galactose (Gal) und/oder terminaler Sialinsäure (NeuAc) vorhanden sind. Wie die Massenspektren der Glycopeptide des intra- und extrazellulären  $\beta$ -TP eindeutig belegen, sind diese N-Glycane in sehr marginalen Mengen vorhanden (siehe Anhang II). So sind in den intra- und extrazellulären Proben eindeutig die Strukturen  $\text{GlcNAcMan}_{3-4}\text{F}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  nachweisbar, wie auch durch ESI-MS-MS bestätigt werden konnte (nicht gezeigt). Lactosaminketten und terminale Sialinsäuren konnten mit den sehr sensitiven massenspektrometrischen Methoden nicht nachgewiesen werden. In keinem Fall wurde ein Hinweis auf biantennäre Ketten, die auf GlcNAc-Transferase II-Aktivität hindeuten, gefunden. Somit läßt sich sicherlich nicht von einer generellen Kapazität zur Ausbildung von *complex-type* Strukturen (Lactosaminketten) bzw. biantennären Ketten ausgehen.

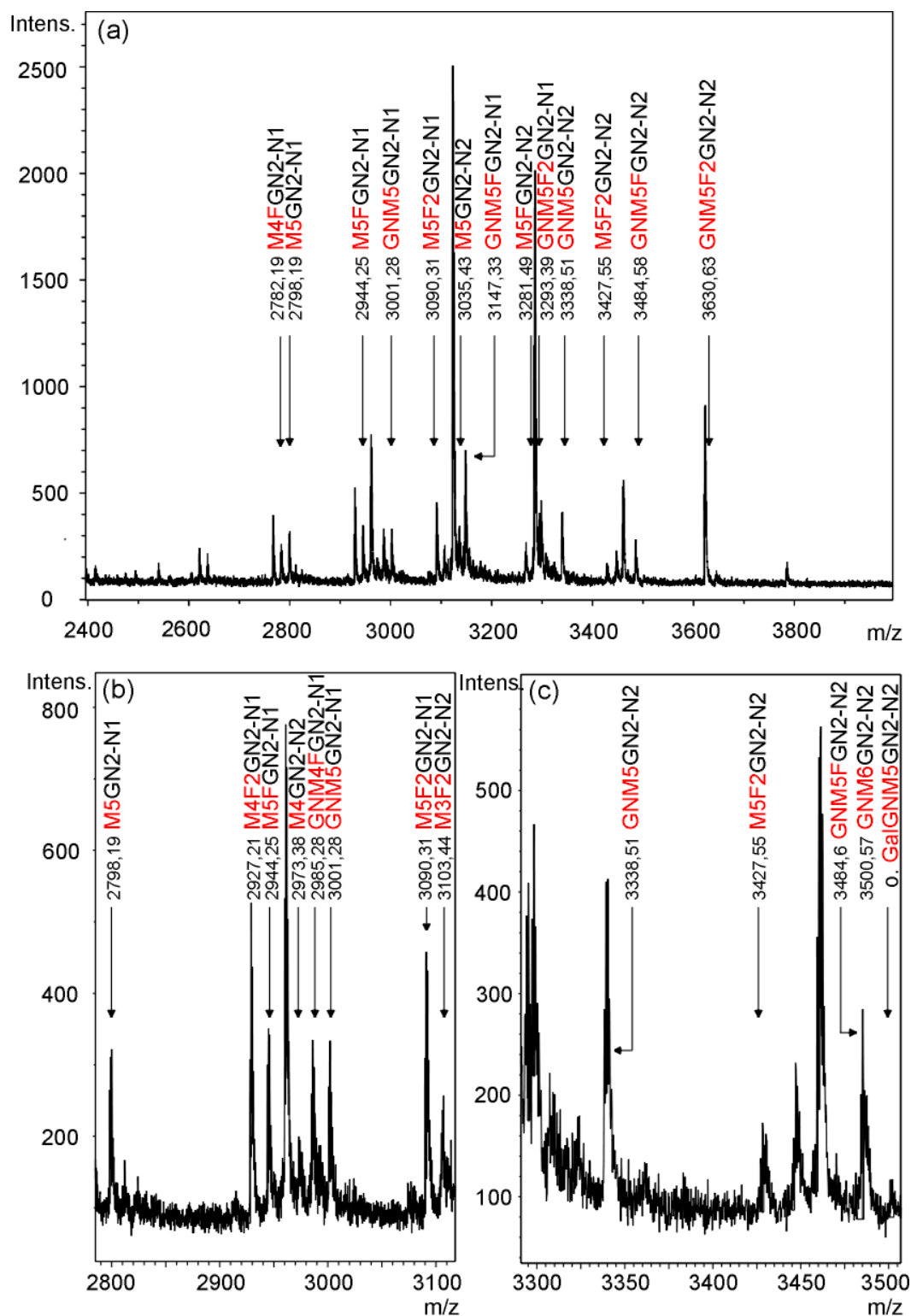
### Zusammenfassung

Die N-Glycane des  $\beta$ -TP aus den extrazellulären Fraktionen repräsentieren das für die einzelnen Insektenzellen typische Glycosylierungspotential mit vorwiegend paucimannosidische Strukturen des Typs  $\text{Man}_{2-3}\text{GlcNAc}_2$ . Die N-Glycane des rekombinanten Modellproteins aus den intrazellulären Fraktionen sind vor allem als oligomannosidische Oligosaccharide ( $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ ) identifiziert, wobei die Majorität die Strukturen  $\text{Man}_{7-8}\text{GlcNAc}_2$  besitzen. In den intra- und extrazellulären Proben konnten eindeutig die Strukturen  $\text{GlcNAcMan}_{3-4}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  nachgewiesen werden. Der Anteil dieser Strukturen an den Gesamt-N-Glycanen liegt zwischen 5 und 10 %. Strukturen mit terminalen Galactosen konnten nicht nachgewiesen werden. Es ergaben sich weiterhin keine Hinweise auf GlcNAc-II-Transferase Aktivitäten und sialylierte Strukturen. Insgesamt zeigt die Charakterisierung der N-Glycane des  $\beta$ -TP aus infizierten Insektenzellen sehr deutlich, daß Insektenzellen nicht in der Lage sind *complex-type* Strukturen auszubilden.

### 3.4.6. Inhibierung der Mannosidase II durch Swainsonin

Insektenzellen können wie allgemein bekannt und wie bei der N-Glycan-Analyse des  $\beta$ -TP detektiert, Proteine proximal  $\alpha$ 1,6- und  $\alpha$ 1,3-fucosylieren. Dagegen ist nicht bekannt, auf welcher Stufe diese Fucosylierungen stattfinden. Sicher scheint zu sein, daß die  $\alpha$ 1,6- bzw.  $\alpha$ 1,3-Fucosyltransferasen nur bei Präsenz des nichtreduzierten terminalen GlcNAcs fucosylieren können (Staudacher und März, 1998, Schachter, 1991, Altmann und März, 1995, Ren et al., 1997). Die einzelnen Schritte dieser Prozessierung konnten bisher von keiner Arbeitsgruppe durch Einzelstrukturen belegt werden, da gerade die Prozessierungsschritte der Glycosylierung in Insektenzellen von  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  zu den reifen Formen  $\text{Man}_{2-3}\text{F}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  sehr schnell ablaufen. In den letzten Jahren hat sich dann auch immer mehr die Ansicht durchgesetzt, daß  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$  zumindest der Hauptakzeptor für die Fucosyltransferasen ist (Altmann, 1999). Die Existenz der detektierten N-Glycane  $\text{GlcNAcMan}_{3-4}\text{Fuc}_{1-2}\text{GlcNAc}_2$  des  $\beta$ -TP legt im Gegensatz dazu nahe, daß die  $\alpha$ 1,3- als auch die  $\alpha$ 1,6-Fucosylierung nicht erst auf der Stufe von  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}$  stattfindet.

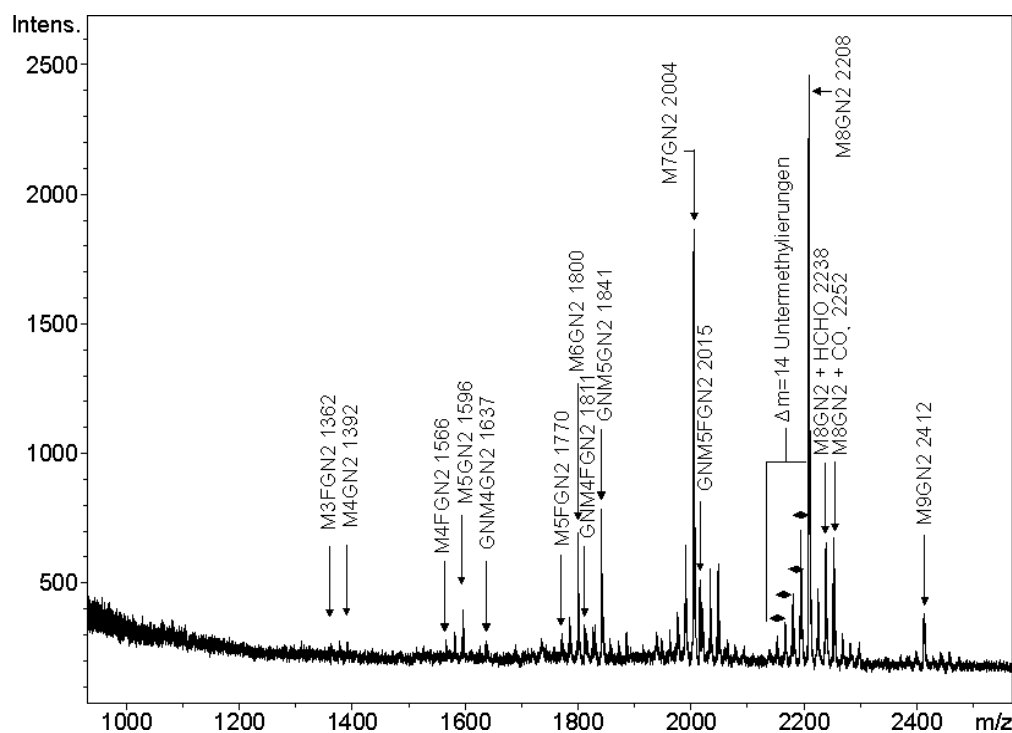
Um die Fucosylierung in Insektenzellen genauer zu untersuchen wurde eine Produktexpression des  $\beta$ -TP unter Supplementierung von Swainsonin durchgeführt. Swainsonin hemmt die Mannosidase II auf der Stufe von  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ . Die Akkumulation dieser N-Glycanstruktur sollte Rückschlüsse bezüglich der Akzeptoreigenschaften für die Fucosyltransferasen erlauben. Dazu wurden High Five Zellen nach 20 Stunden nach der Infektion mit 10  $\mu\text{M}$  Swainsonin supplementiert und für 10 h im Brutraum bei 27 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen aufgearbeitet, die cytosolische Fraktion isoliert (UZÜ) und das  $\beta$ -TP durch Affinitätschromatographie gereinigt. 1 mg des synthetisierten Proteins wurde zur Analyse der N-Glycane verwendet. Abb. 39 zeigt einen Ausschnitt aus dem Massenspektrum der Glycopeptide. Insgesamt zeigt sich eine signifikante Erniedrigung der reifen sekretorischen Formen des  $\beta$ -TP, während sich wie erwartet die Verteilung der *high-mannose-type* Glycane nicht ändert. Durch die Inhibierung der Mannosidase II-Aktivität sind neben den zuvor durch die Analyse der N-Glycane des  $\beta$ -TP detektierten



**Abb.39.** Ausschnitt aus dem MALDI-MS der Glycopeptide des  $\beta$ -TP aus High Five Zellen nach Inhibierung der Mannosidase durch 10  $\mu$ M Swainsonin. (b) und (c) sind vergrößerte Ausschnitte aus (a). M, Mannose; F, Fucose; GN, N-Acetylglucosamin.

Strukturen  $\text{GlcNAc}_{3-4}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  (siehe 3.4.5.) die zuvor nicht detektierbaren Intermediate der Glycoprotein-Prozessierung  $\text{Man}_4\text{FucGlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_4\text{Fuc}_2\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAcMan}_5\text{FucGlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAcMan}_5\text{Fuc}_2\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_5\text{FucGlcNAc}_2$  und  $\text{Man}_5\text{Fuc}_2\text{GlcNAc}_2$  detektierbar. Um die durch Analyse der Glycopeptide experimentell ermittelten N-Glycane zweifelsfrei nachzuweisen, wurden die Glycopeptide mit PNGase F verdaut und wiederum chromatographisch getrennt. Die bifucosylierten Strukturen waren nach Rechromatographie in der Glycopeptidfraktion durch MALDI-MS wieder eindeutig identifizierbar.

Die freigesetzten N-Glycane wurden reduziert, permethyliert und durch HPAEC-PAD, MALDI-MS, ESI-MS bzw. ESI-MS-MS analysiert. Die MALDI-MS-Analyse bestätigte durch die experimentell ermittelten Massen 1392, 1566, 1770, 1841, 2015, 1637 und 1811 m/z die Existenz der Strukturen  $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_4\text{FucGlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_5\text{FucGlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAcMan}_5\text{FucGlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAcMan}_4\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{GlcNAcMan}_4\text{FucGlcNAc}_2$  (Abb.40).

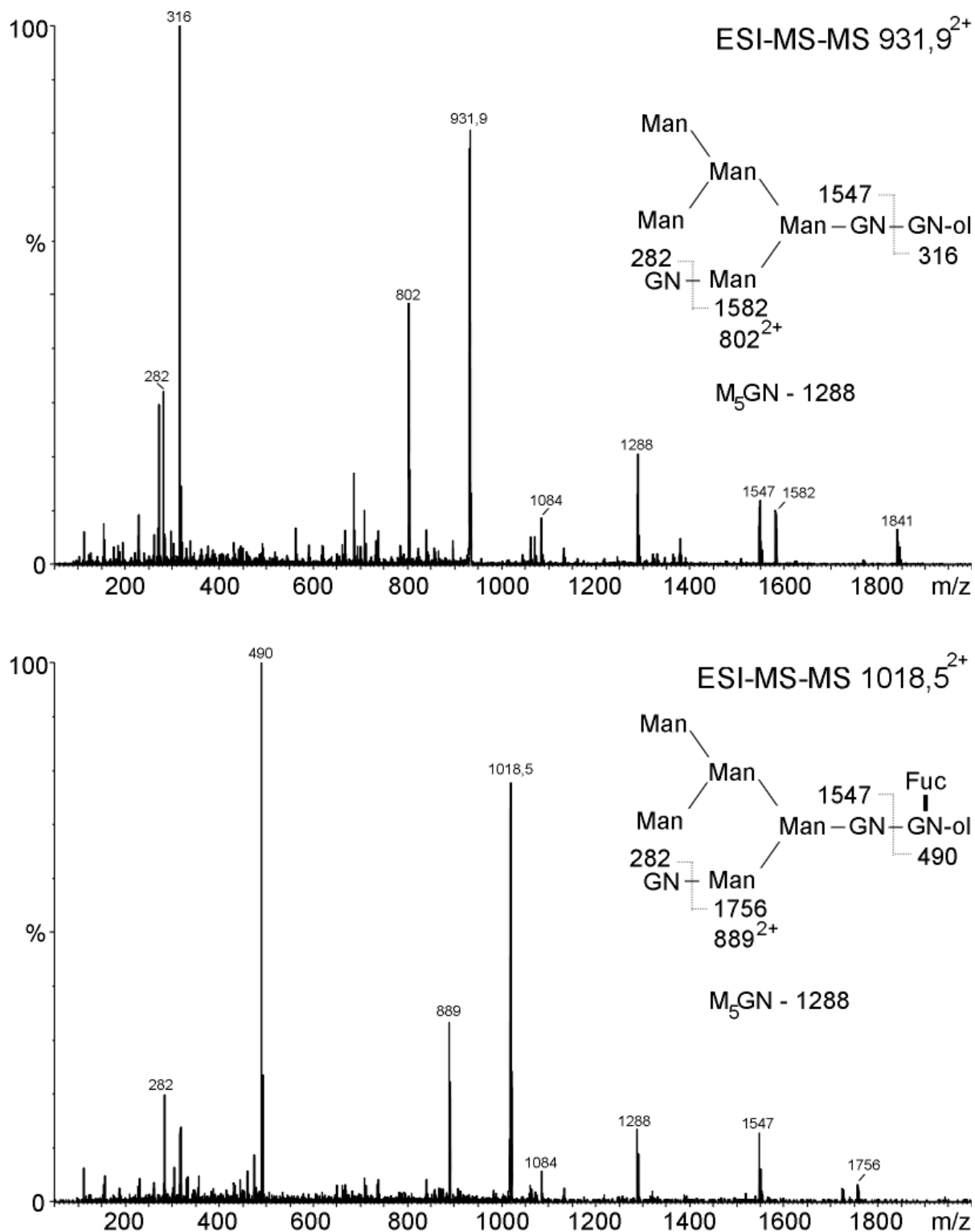


**Abb.40.** MALDI-MS permethylierter N-Glycane des  $\beta$ -TP aus High Five Zellen nach Inhibierung der Mannosidase II durch Swainsonin. Exemplarisch sind die identifizierten Strukturen der  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -Struktur mit ihren Untermethylierungen und mit dem HCHO- und dem  $\text{CO}_2$ - Peak dargestellt. M, Mannose; F, Fucose; GN, N-Acetylglucosamin.

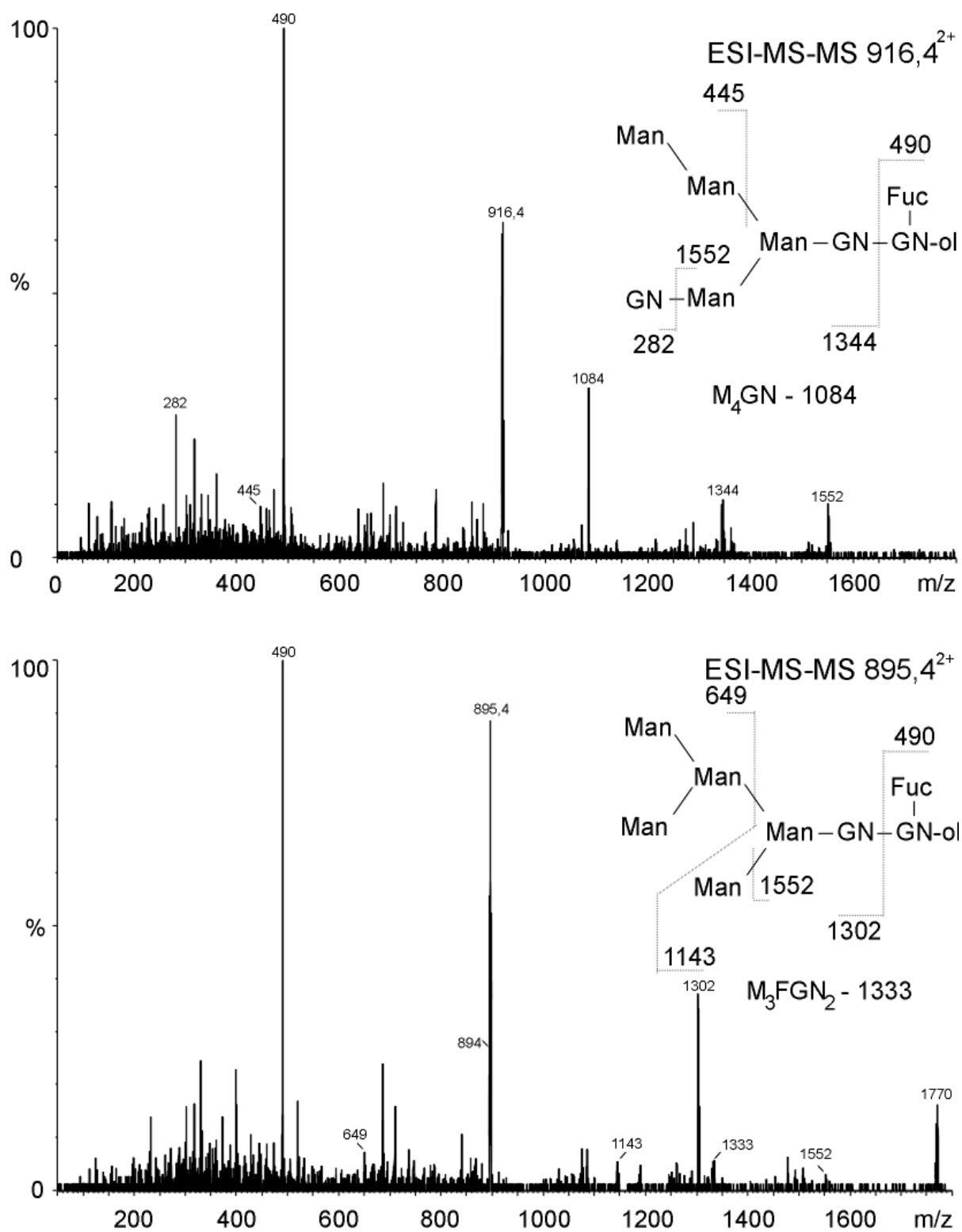
Um die Identität der N-Glycane eindeutig zu beweisen, wurden ESI-MS-MS-Untersuchungen durchgeführt. Bei der ESI-MS-MS-Analyse erfolgt mittels des ersten Massenseparators die Ausblendung des Mutterions aus einem ionisierten Gemisch (z.B. ein bestimmtes N-Glycan), welches dann in einer Kollisionszelle durch Beschuß mit Inertgas fragmentiert wird. Die entstehenden Tochterionen werden dann im zweiten Massenspektrometer getrennt und anschließend detektiert. Aus den Tochterionen lassen sich Rückschlüsse auf die Struktur des ausgeblendeten Mutterions ziehen.

Die Ergebnisse sind für die Molekülonen 1770, 1841, 2015 und 1811 m/z in den Abbildungen 41 und 42 dargestellt, die jeweils durch die jeweiligen charakteristischen Tochterionen die Existenz dieser Strukturen eindeutig belegen. Die Existenz der N-Glycane  $\text{GlcNAcMan}_6\text{GlcNAc}_2$  bzw.  $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  (2045 m/z) und  $\text{Man}_6\text{FucGlcNAc}_2$  (1974 m/z) konnten durch ESI-MS-MS nicht eindeutig bestätigt werden, da diese beiden Strukturen nur sehr wenig vorhanden sind. Im MALDI-Spektrum der permethylierten Glycane werden diese beiden N-Glycane durch ein an  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  gelagertes  $\text{CO}_2$ -Fragment bzw. ein zweifach untermethyliertes Fragment von  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  überdeckt, so daß in der ESI-MS-MS-Analyse die Fragmente von  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  detektiert werden. Die Analyse der Glycopeptide deutet aber auf die Existenz von Lactosaminketten in marginaler Konzentration hin.

Damit konnte erstmals in infizierten Insektenzellen durch den Einsatz des Glycosylierungsinhibitors Swainsonin die komplette Kaskade der einzelnen Prozessierungsschritte von  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  zu  $\text{Man}_{2-3}\text{Fuc}_{0-1}\text{GlcNAc}_2$  durch Identifizierung der einzelnen Intermediate nachgewiesen werden. Wie sich anhand der analysierten Strukturen nun zweifelsfrei nachweisen läßt, ist nicht das Glycan  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$  der Akzeptor für die Fucosyltransferasen, sondern vielmehr das Oligosaccharid  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ , wodurch die Strukturen  $\text{GlcNAcMan}_5\text{Fuc}_{1-2}\text{GlcNAc}_2$  entstehen. Über die Intermediate  $\text{GlcNAcMan}_4\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  entstehen dann die reifen sekretorischen  $\text{Man}_{2-3}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$ -Ketten. Alternativ scheinen aber Insektenzellen auch einen anderen Weg benutzen zu können. Offenbar ist die N-Acetylglucosamidase in der Lage in Konkurrenz zur Mannosidase II zu treten. Dadurch werden N-Glycane



**Abb.41.** ESI-MS-MS der permethylierten Glycane (Mutterionen) 931,9<sup>2+</sup> (oben) und 1018,5<sup>2+</sup> (unten) aus dem intrazellulären Pool von  $\beta$ -TP aus High Five Zellen. Die detektierten Tochterionen beweisen eindeutig die Existenz der N-Glycan-Strukturen  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{GlcNAcMan}_5\text{FucGlcNAc}_2$ .



**Abb.42.** ESI-MS-MS der permethylierten Glycane (Mutterionen)  $916,4^{2+}$  (oben) und  $895,4^{2+}$  (unten) aus dem intrazellulären Pool von  $\beta$ -TP aus High Five Zellen. Die detektierten Tochterionen beweisen eindeutig die Existenz der N-Glycan-Strukturen  $\text{GlcNAcMan}_4\text{FucGlcNAc}_2$  und  $\text{Man}_5\text{FucGlcNAc}_2$ .



mit den Strukturen  $\text{Man}_5\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  generiert, die kein Substrat für die Mannosidase II darstellen und somit nicht weiter prozessiert werden sollten. Die relativ hohen Konzentrationen von  $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$  in den intra- und extrazellulären Glycopeptidfraktionen des  $\beta$ -TP legen daher nahe, daß entweder die N-Glycane einer Proteinalterung (Hydrolyse) unterliegen oder daß andere Mannosidasen vorhanden sind, die die Mannosen von dem  $\alpha 1,6$ -Arm entfernen können.

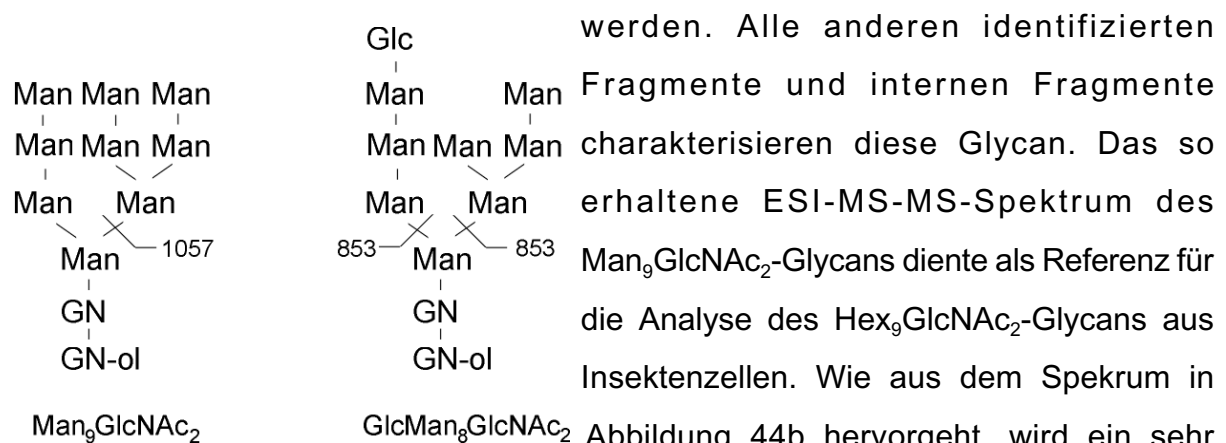
### Zusammenfassung

Der Einsatz von Swainsonin ermöglichte erstmals die einzelnen Biosyntheseschritte der Glycoproteinprozessierung von  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  zu den reifen Strukturen  $\text{Man}_{2-3}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  durch Einzelstrukturen nachzuweisen. Eindeutig konnte gezeigt werden, daß  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  der Akzeptor für die Fucosyltransferasen ist und nicht das Glycan  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ .

#### 3.4.7. Degradation des $\beta$ -TP in Insektenzellen

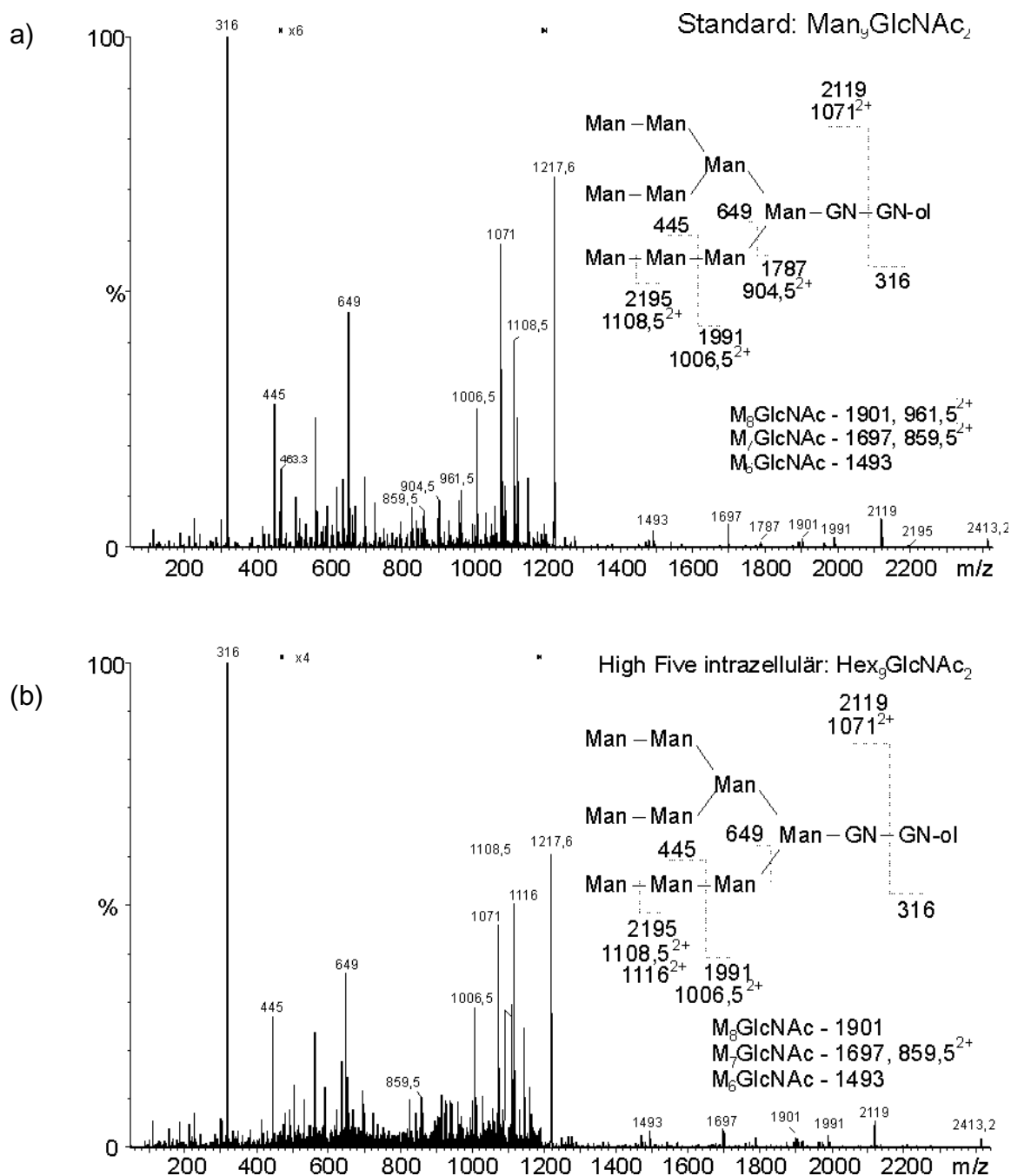
Für die Degradation von Glycoproteinen wird die Entfernung einer Mannose durch eine ER-residente  $\alpha 1-2$ -Mannosidase als Zeitschalter für Glycoproteindegradation angesehen (Helenius, 1994, Liu et al., 1999). Insbesondere wurde kürzlich ein  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -Glycan mit einer entfernten Mannose am mittleren Zweig, generiert durch die Mannosidase I, als essentielles Signal für die Degradation identifiziert (Jakob et al., (1998)). Die zentrale Rolle als Faltungssensor kommt der Glucosyltransferase zu, nicht nur für den Calnexin/Calreticulin-Zyklus, sondern auch für das *Targeting* falsch gefalteter Proteine zur Degradation. Neu synthetisierte, korrekt gefaltete Glycoproteine mit getrimmten Mannosen können das ER verlassen, da keine Glucose die Bindung zum Calnexin/Calreticulin-Zyklus vermittelt. Persistent falsch gefaltete Proteinketten werden für die Degradation durch die Mannosidase I markiert und generieren das  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -Glycan. Nach der Reglucosylierung durch die Glucosyltransferase bindet das Protein an Calnexin/Calreticulin. Da das  $\text{GlcMan}_8\text{GlcNAc}_2$  im Gegensatz zu  $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$  ein schlechtes Substrat für die

Glucosidase II ist (Liu et al., 1999), bleibt das Glycoprotein mit Calnexin/Calreticulin assoziiert, wird in das Cytosol überführt, deglycosyliert und durch das 26S-Proteasomen abgebaut. Wie aus der Analyse der intrazellulären Glycane aus Insektenzellen deutlich hervorgeht, ist die  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -Struktur neben  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  das Hauptglycan und könnte damit ein für die Degradation markiertes Intermediat darstellen. Um das zu bestätigen, sollten aber signifikante Mengen des Glycans  $\text{Hex}_9\text{GlcNAc}_2$  der glucosylierten Form  $\text{GlcMan}_8\text{GlcNAc}_2$  entsprechen. Als Strategie wurde die Fragmentierungsanalyse des permethylierten  $\text{Hex}_9\text{GlcNAc}_2$  durch ESI-MS-MS und damit eine indirekte Identifizierungsstrategie gewählt. Hierbei sollte aufgrund der N-Glycanstruktur bei der glucosylierten Variante das Fragment  $\text{Hex}_4$  (853,48) sichtbar sein (Abb. 43). Für  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  wird theoretisch das Fragment  $\text{Hex}_5$  (m/z 1057) erwartet. In der Praxis werden diese Fragmente jedoch häufig nicht generiert, so daß zunächst für die Experimente ein  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Standard eingesetzt wurde (Abb. 44a). Identifiziert werden konnten eindeutig die Fragmente  $\text{Hex}$  (227 m/z),  $\text{Hex}_2$  (445 m/z) und  $\text{Hex}_3$  (649 m/z).  $\text{Hex}_4$  (m/z 853) war wie erwartet nicht detektierbar. Das Fragment  $\text{Hex}_5$  (1057 m/z) konnte nicht eindeutig identifiziert werden, was die Existenz von  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  eindeutig beweisen würde. Es scheint nur sehr selten gebildet zu



**Abb.43.** Strategie zur Differenzierung von  $\text{Hex}_9\text{GlcNAc}_2$  in  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{GlcMan}_8\text{GlcNAc}_2$ . Nach der Theorie sollten beide Glycane ein spezifisches Tochterion in der ESI-MS-MS-Analyse aufweisen, wobei bei  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  das  $\text{Hex}_5$ -Fragment (m/z 1057) und bei  $\text{GlcMan}_8\text{GlcNAc}_2$  das  $\text{Hex}_4$ -Fragment zu identifizieren sein müßte.

ähnliches Fragmentierungsmuster erhalten. Die Existenz von  $\text{Hex}_4$  (853,48) kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die absolute Majorität sollte aber der Struktur



**Abb.44.** ESI-MS-MS-Analyse von  $\text{Hex}_9\text{GlcNAc}_2$ . Als Referenz für die Untersuchung diente ein zuvor erstelltes Spektrum des  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Standards (a). Dazu wurden 500  $\mu\text{g}$  reduziert, permethyliert und durch ESI-MS-MS analysiert. (b) zeigt das Fragmentierungsmuster der  $\text{Hex}_9\text{GlcNAc}_2$ -Struktur aus dem intrazellulären Pool aus High Five Zellen. Jeweils rechts sind die Strukturen mit den eindeutig identifizierten Tochterionen angegeben. Bei den untenstehenden Tochterionen handelt es sich um interne Fragmente.

Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> entsprechen. In Anbetracht dessen, daß die Hex<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Formen intrazellulär 5 % im Falle von High Five Zellen bzw. 1,5 % in Sf21 Zellen ausmachen und die Hex<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Glycane fast ausschließlich die Struktur Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> aufweisen, kann davon ausgegangen werden, daß die primäre Qualitätskontrolle durch den Calnexin/Calreticulin-Zyklus sicherlich nicht kausal für die Akkumulation des rekombinanten Proteins verantwortlich ist.

### **Zusammenfassung**

Der Calnexin/Calreticulin-Zyklus (Bindung der Lektine an die Strukturen GlcMan<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) hat keinen Einfluß auf die Akkumulation der glycosylierten Biosyntheseintermediate. Wie die Analyse der Struktur Hex<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> belegt, liegt das N-Glycan GlcMan<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, falls überhaupt existent, in äußerst geringen Mengen vor.

#### **3.4.8. Analyse der N-Glycane des $\beta$ -TP aus der Übergangsphase (20 h p.i.)**

Wie in *pulse-chase* Experimenten gezeigt (siehe 3.3.4.2.), verlängert sich die Zeit, die zur vollständigen Sekretion benötigt wird, mit zunehmender Infektionszeit, was mit der zunehmenden Ablagerung des rekombinanten Modellproteins in sich fusionierenden großen Vesikeln einhergeht. Wie aus den Kinetiken der Produktbildung des  $\beta$ -TP hervorgeht, besteht ein sehr kleines Zeitfenster bei 20 h p.i. (Übergangsphase), in dem die Glycosylierungsintermediate (Banden 4 und 5) und die nicht glycosylierten Proteinformen (Bande 6) intrazellulär nicht nachweisbar oder nur marginal vorhanden sind (3.3.4.) und wo, wie anhand der elektronenmikroskopischen Untersuchung gezeigt, die Kompartimentierung der Zelle noch in Ordnung ist (3.2.2.). Um dieses Zeitfenster in Bezug auf die intrazellulären N-Glycane zu untersuchen, wurden ca. 1 mg  $\beta$ -TP aus diesem Zeitfenster aufgereinigt und die Glycopeptide durch MALDI-MS-TOF näher untersucht (Abb. 45). Die identifizierten Strukturen sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Wie aus der Analyse hervorgeht, unterscheidet sich das MALDI-MS sehr deutlich von dem Spektrum nach 72 h p.i. (Anhang II, Abb.A1, Tab. I). Während *high-mannose-type* Formen nur marginal vorhanden sind, weist die absolute Majorität

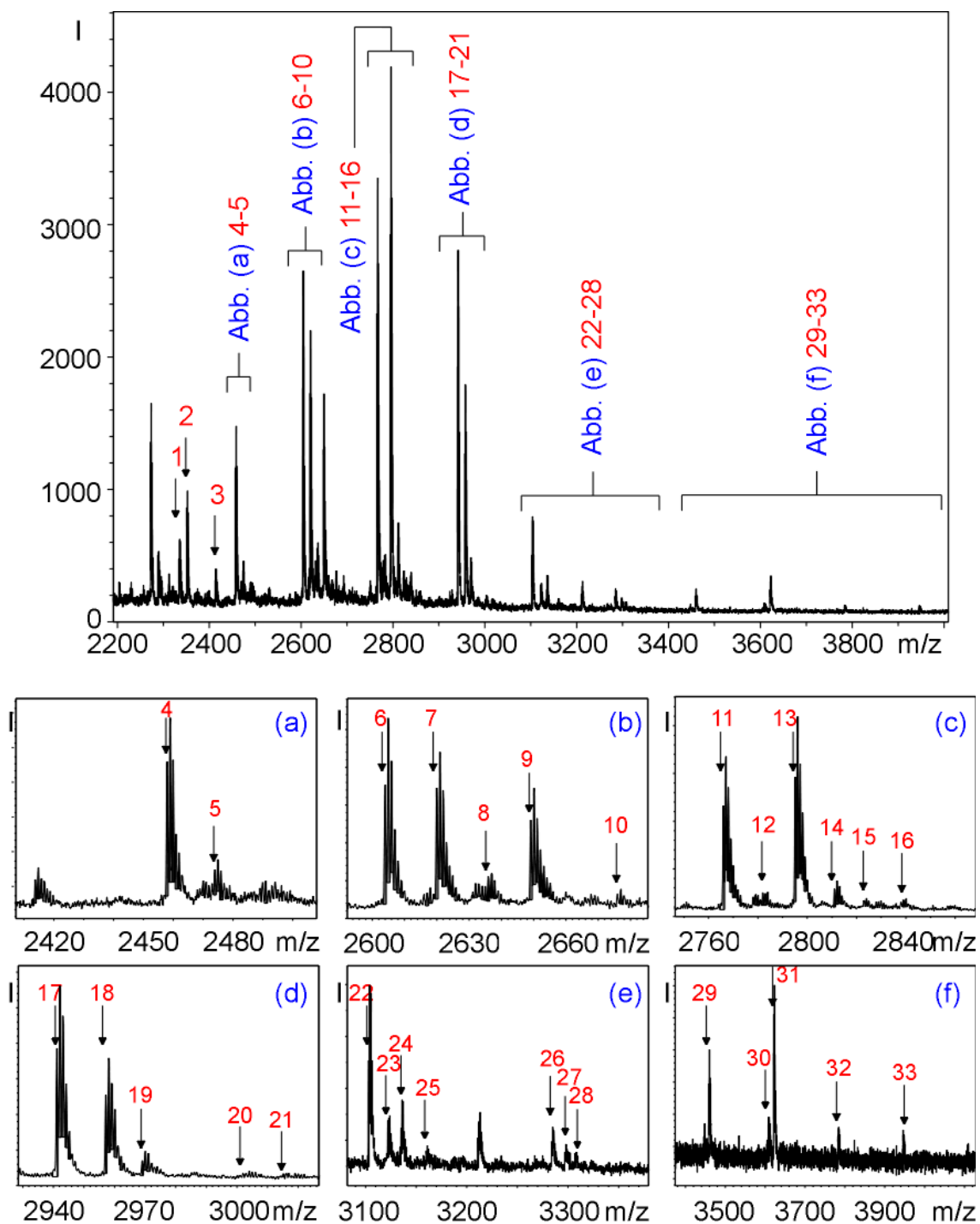
**Tab.6.** Identifizierte N-Glycane aus der Glycopeptidfraktion des intrazellulären  $\beta$ -TP aus High Five 20 h p.i (siehe Abb. 48). Die Hauptstrukturen sind in roter Farbe hervorgehoben.

Peak Nr.	M <sub>i</sub> (Da)	N-Glycan	Peak Nr.	M <sub>i</sub> (Da)	N-Glycan
(N1/2-Glycosylierungsstelle, M Mannose, GN N-Acetylglucosamin, F Fucose, Hex Hexose; G, Glucose)					
1	2311,0	M2GN2-N1	18	2957,4	M3FGN2-N2
2	2352,2	Fragment T11	19	2969,3	GNM3F2GN2-N1
3	2414,1	F2GN-N1	20	3001,4	GNM5GN2-N1
4	2458,2	M2FGN2-N1	21	3014,5	GNM3GN2-N2
5	2474,2	M3GN2-N1	22	3103,5	M3F2GN2-N2
6	2604,2	M2F2GN2-N1	23	3122,4	M7GN2-N1
7	2620,2	M3FGN2-N1	24	3135,5	M5GN2-N2
8	2636,2	M4GN2-N1	25	3160,5	GNM3FGN2-N2
9	2649,4	M2GN2-N2	26	3284,5	M8GN2-N1
10	2677,2	GNM3GN2-N1	27	3297,6	M6GN2-N2
11	2766,4	M2F2GN2-N1	28	3306,5	GNM3F2GN2-N2
12	2778,5	MF2GN2-N2	29	3459,6	M7GN2-N2
13	2795,5	M2FGN2-N2	30	3607,5	GM9GN2-N1
14	2811,4	M3GN2-N2	31	3621,7	M8GN2-N2
15	2823,3	GNM3FGN2-N1	32	3783,6	M9GN2-N2
16	2839,2	GNHex4GN2-N1	33	3945,7	GM9GN2-N2
17	2941,4	M2F2GN2-N2			

paucimannosidische Strukturen auf, wobei die fucosylierten Varianten deutlich in der Mehrheit sind. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit zuvor durch *western blotting* erhaltenen Ergebnissen und zeigen sehr deutlich, daß zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion die Akkumulation des rekombinanten Proteins nicht zu beobachten ist. So können kaum Vorstufen detektiert werden, die dem biglycosylierten Intermediat (Bande 4, 28 kDa) entsprechen, so daß diese erst durch den Verlust der kompartmentären Strukturen entsteht und dadurch die weitere Prozessierung verlangsamt wird. Wie die *pulse-chase* Experimente nahelegen, verstärkt sich dieser Prozeß im Verlauf der Infektion. Interessanterweise zeigen sich an beiden Glycosylierungsstellen die Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Varianten, was auf eine noch intakte Qualitätskontrolle durch Bindung von Calnexin und/oder Calreticulin hindeutet.

### Zusammenfassung

In der Übergangsphase unterscheiden sich die intrazellulären N-Glycane des  $\beta$ -TP nicht von den extrazellulären N-Glycanen und weisen Strukturen des Typs Man<sub>2-3</sub>Fuc<sub>0-2</sub>GlcNAc<sub>2</sub> auf.



**Abb.45.** MALDI-MS-TOF der Glycopeptidfraktion des intrazellulären  $\beta$ -TP 20 h p.i. aus High Five Zellen. Die Zahlen kennzeichnen die identifizierten Strukturen, die in Tabelle 6 zusammengefaßt sind. (a)-(f), Ausschnitte aus dem Hauptspektrum.

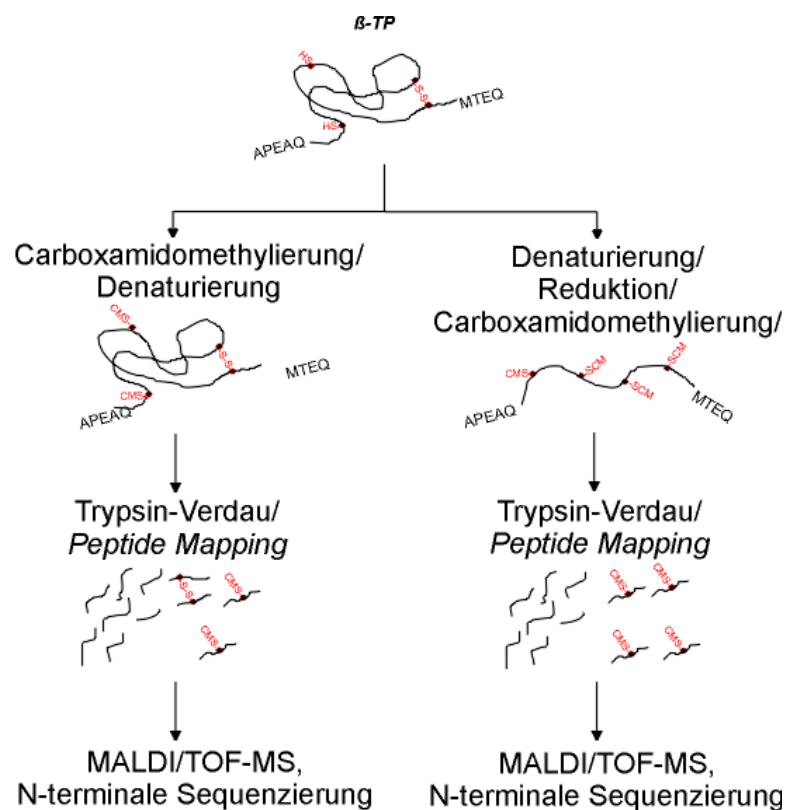
### 3.4.9. Disulfidbrückenanalytik

#### 3.4.9.1. Strategie der Disulfidbrückenanalytik

Um zu überprüfen, ob es beim ko- und posttranslationalen Prozeß der Proteinfaltung, speziell der Bildung von Disulfidbrücken, zu fehlerhaften Disulfidverbrückungen kommt, wurde eine detaillierte Analyse des Thiol/Disulfidstatus des intra- und extrazellulären  $\beta$ -TP durch eine Kombination aus *peptide mapping* und MALDI/TOF-MS durchgeführt. Die Analyse durch MALDI/TOF-MS gewährleistet dabei die eindeutige Identifizierung von intramolekularen Disulfiden und gemischten Disulfiden sowie die Analyse der Oxidationsstufen der einzelnen Thiole. Die Reinigung des intrazellulären rekombinanten Modellproteins erfolgte unter Schutzgasatmosphäre (Stickstoff), denn durch den Luftsauerstoff kommt es zu Autooxidationen an den Thiolen bzw. Thiolaten, wobei freie Radikale (Thiyl-Radikale) entstehen, die dann eine neue Disulfidbrücke ausbilden oder den Sauerstoff in das sehr reaktive  $O_2^-$ -Anion überführen. Dieses generiert nachfolgend sofort wieder Thiyl-Radikale, wodurch es letztendlich zu sehr schnellen Austauschreaktionen der Disulfidbrücken kommen kann (Creighton, 1984). Die Durchführung der Experimente unter  $N_2$ -Atmosphäre erfolgte wie unter 2.12. beschrieben.

Wie in der Einleitung kurz erläutert, ist über die genaue Struktur des  $\beta$ -TP sehr wenig bekannt. So existieren auch unterschiedliche Daten bezüglich des Disulfidbrückenstatus. Anhand von Datenbanksequenzvergleichen der Aminosäuresequenz wird eine Zugehörigkeit zur Familie der Lipocaline postuliert, einer Gruppe von sekretorischen Proteinen, die kleine lipophile Moleküle binden und transportieren (Nagata et al., 1991). Strukturell sollte es sich demnach um Proteine handeln, die ein antiparalleles  $\beta$ -Faß, mit Cys43 in der hydrophoben Tasche, bilden. Cys67 und Cys164 sind dabei die konservativsten Aminosäuren und bilden eine intramolekulare Disulfidbrücke (siehe Abb. 46, Disulfidbrücke zwischen T9 und T19). Aufgrund dieser vermeintlichen Lipocalin-Struktur wird auch beim  $\beta$ -TP diese Disulfidbrücke postuliert. Zu einer gänzlich entgegengesetzten Aussage kommt hingegen Link (1967), der anhand von Reduktions / Alkylierungs-Experimenten auf die Existenz von zwei Disulfidbrücken

schloß. Davon ausgehend war es also erst einmal nötig, den Thiolstatus der sekretorischen Varianten des  $\beta$ -TPs zu bestimmen. Dazu wurden in einer Zwei-Wege-Strategie jeweils 1 mg des Standard  $\beta$ -TP aus High Five Zellen eingesetzt (Abb. 45).



**Abb.45.** Strategie zur Analyse des Thiolstatus des  $\beta$ -TP. Während der Standard aus High Five zusätzlich zur Identifizierung der generierten carboxamidomethylierten Peptide genutzt wurde, erfolgte bei allen anderen Proben lediglich die Analyse des Thiolstatus durch Carboxamidomethylierung und Denaturierung.

**-SH**; freie Thiolgruppen; **CMS-**, S-(Carboxamidomethyl)cystein; **-S-S-**, Disulfidbrücke.

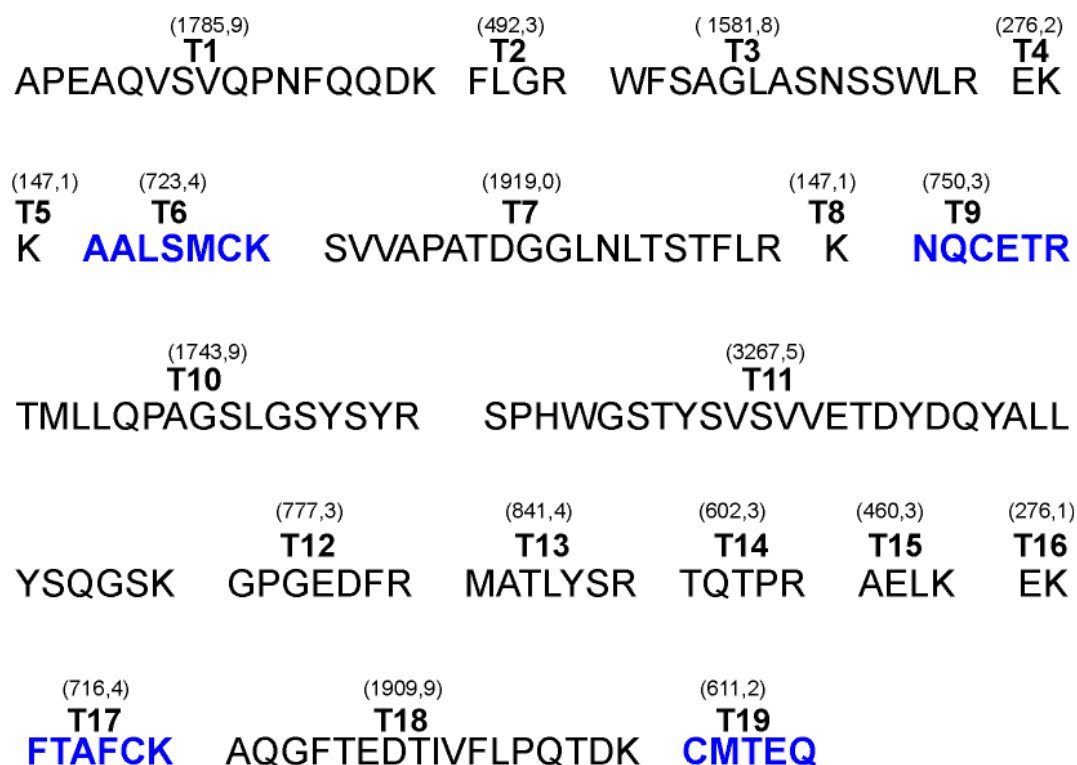
So sollte zunächst durch Denaturierung/Reduzierung/Carboxamidomethylierung mit anschließender tryptischer Spaltung anhand des tryptischen Maps (RP-HPLC) die alkylierten cysteinhaltigen Peptide T6, T9, T17 und T19 identifiziert und untersucht werden (siehe Abb. 45). In einem zweiten Ansatz sollte dann durch Carboxamidomethylierung/Denaturierung der Disulfidbrückenstatus bestimmt werden. Bei der Ausbildung von Disulfidbrücken in Proteinen handelt es sich um dynamische Gleichgewichte, die sich über die Zeit und unter bestimmten Bedingungen (z.B. pH-



Wert) immer wieder unter Ausbildung anderer Disulfidbrücken verändern können. Bei korrekter Analyse können daher nur bestimmte thermodynamisch stabile Zustände detektiert werden. Kausal dafür verantwortlich sind freie Thiole bzw. genauer Thiolate, die starke Nucleophile darstellen und eine  $S_N$ -Reaktion an einer bestehenden Disulfidgruppe ausführen, was zu intramolekularen Austauschreaktionen und letztendlich zu Fehlinterpretationen bei der Brückenanalytik führt. Die Geschwindigkeit des Austausches steigt dementsprechend mit zunehmendem pH-Wert durch die zunehmende Stabilität der Thiolate. Um diese Reaktionen möglichst schnell zu unterbinden, ist eine sehr schnelle effiziente Alkylierung erforderlich. Dazu muß zuerst alkyliert und dann denaturiert werden, da im umgekehrten Falle die Alkylierungsgeschwindigkeit im Vergleich zur Geschwindigkeit des Disulfidaustausches nicht schnell genug erfolgt, und dann im wesentlichen Intermediate durch die Analysemethode generiert werden, die nicht den eigentlichen nativen stabilen Brücken entsprechen.

#### **3.4.9.2 Analyse des Thiol/Disulfidbrückenstatus des extrazellulären $\beta$ -TPs**

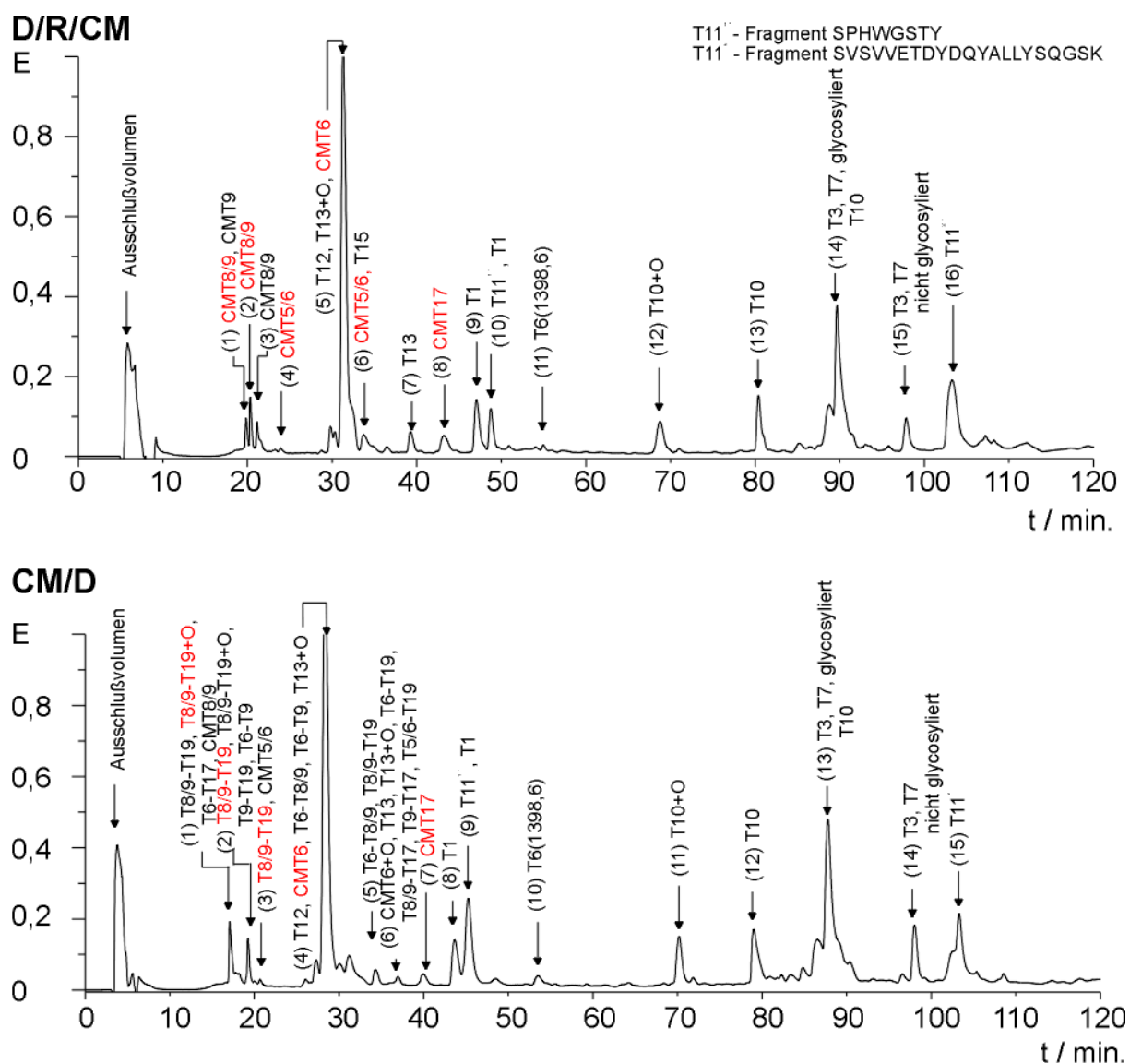
Die Analyse der Disulfidbrücken des  $\beta$ -TP erfolgte mit Hilfe des Standards aus High Five Zellen und wie zuvor beschrieben. Dazu wurden in einem parallelen Ansatz jeweils 1 mg des Proteins denaturiert/reduziert und carboxamidomethyliert (D/R/CM) bzw. carboxamidomethyliert und dann denaturiert (CM/D). In Abb. 46 sind die durch das Programm PAWS kalkulierten tryptischen Peptide dargestellt, wobei für T3 und T7 jeweils die nicht glycosylierten Peptide als Grundlage für die Berechnung dienten. Wie aus der Abbildung hervorgeht, entsteht durch die Trypsin-Behandlung ein recht kleines cysteinhaltiges Peptid (T19) mit Cys164, was in der MALDI/TOF-MS-Analyse aufgrund von Kontaminationen in diesem Massenbereich (Matrixbestandteile etc.) Probleme bereiten kann. Die Isolierung dieses Peptides ist generell schwierig, da das Peptid unter RP-HPLC Versuchsbedingungen wahrscheinlich wegen seines hydrophilen Charakters sehr schlecht oder gar nicht an das Säulenmaterial ( $C_{18}$ ) bindet und dadurch im Durchlauf eluiert. Verstärkt werden diese Probleme zusätzlich durch



**Abb.46.** Aminosäuresequenz von  $\beta$ -TP und mögliche, durch das Programm PAWS kalkulierte, tryptische Peptide (T1-19). Die in den Klammern stehenden Zahlen kennzeichnen die monoisotopischen Massen  $[M+H]^+$  der einzelnen tryptischen Peptide vor der Alkylierung durch Iodacetamid, wobei im Falle von T3 und T7 das nicht glycosylierte Peptid als Grundlage für die Berechnung diente. Die cysteinhaltigen Peptide sind blau hervorgehoben.

Oxidationen am M und C bzw. S-(carboxamido-methyl)cystein. Alternativ wurde deswegen versucht, durch Verwendung einer anderen Protease (Endoproteinase Glu-C) größere Fragmente zu erzeugen, die die Isolierung und Analytik erleichtern. Wie sich dabei zeigte, können andere Proteasen nicht verwendet werden, weil für einen vollständigen Verdau Inkubationszeiten von 72 h nötig sind, wodurch der Verdau sehr unspezifisch wird und dadurch keine Analyse durchgeführt werden kann. Daher wurde als Kompromiß wegen seiner schnellen und effizienten Spaltung Trypsin benutzt.

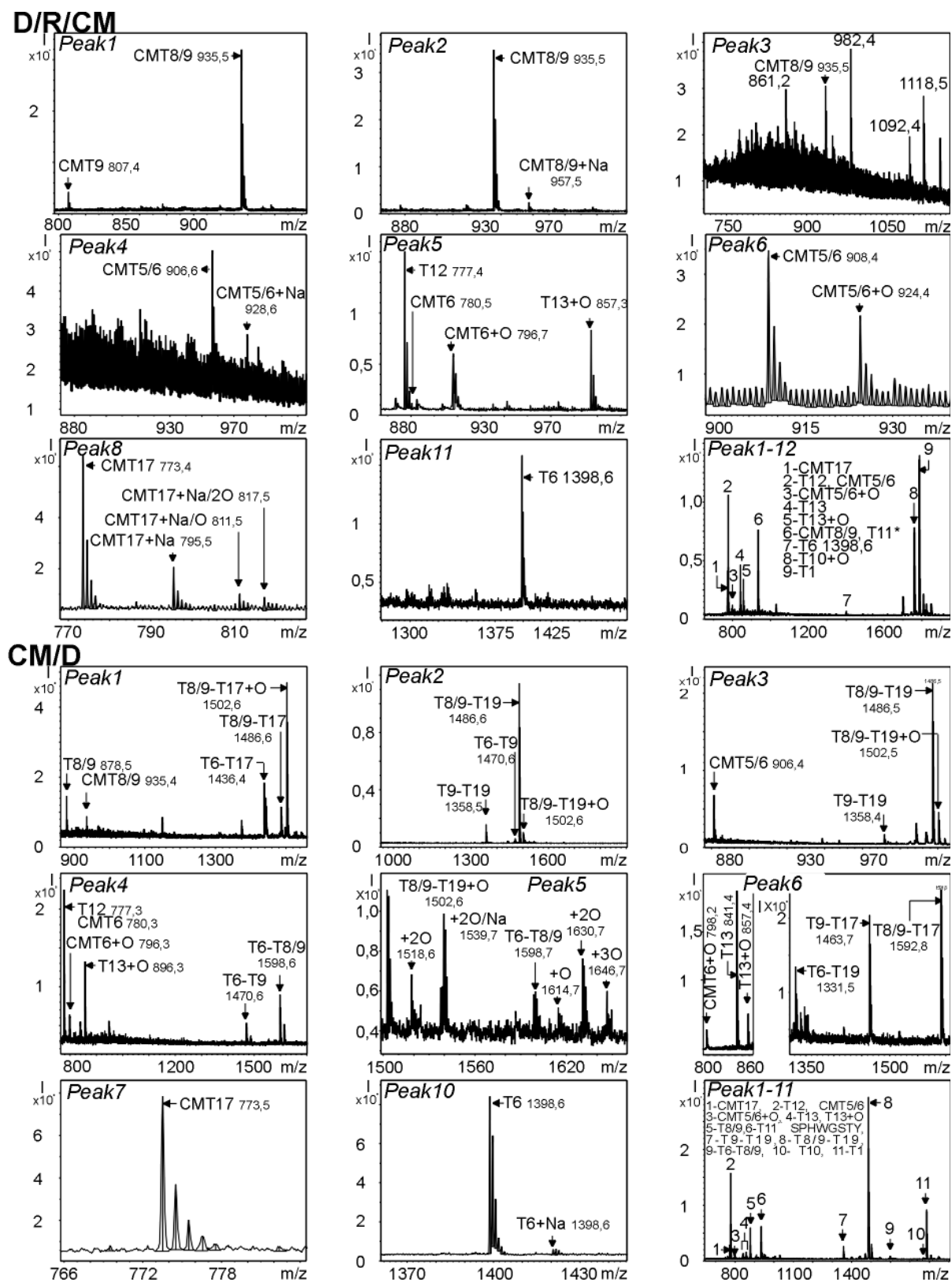
Verdaut wurde das  $\beta$ -TP für jeweils 6 h bei einer Konzentration von 6 % (w/v) Trypsin, wobei jeweils 3 % am Anfang und wiederum 3 % nach 3 h zugegeben wurden. Der vollständige Verdau wurde durch SDS-PAGE überprüft (nicht gezeigt). Abbildung 47 zeigt die tryptischen *fingerprints*, die nach vollständigem Verdau des Proteins und



**Abb.47.** Tryptische Maps des  $\beta$ -TP nach vollständigem Verdau. Nach dem Verdau wurden jeweils 50 % des Ansatzes auf eine C18-Säule gegeben und eine RP-HPLC durchgeführt. D/R/CM: Das Protein wurde denaturiert, reduziert und dann carboxamidomethyliert. CM/D: Das Protein wurde carboxamidomethyliert und dann denaturiert. Die in rot dargestellten Peptide kennzeichnen die Hauptstrukturen der jeweiligen Peakfraktion und zeigen Cystein-haltige Peptide. Verbindungslinien (z.B. T8/9-T19) zwischen zwei Peptiden repräsentieren Disulfidbrücken.

anschließender RP-HPLC an einer C<sub>18</sub>-Säule erhalten wurden. Die einzelnen Peakfraktionen wurden gepoolt und durch MALDI/TOF-MS und N-terminale Sequenzierung analysiert. Die einzelnen MALDI/TOF-MS-Spektren der cysteinhaltigen Peakfraktionen sind in Abbildung 48 dargestellt und die Ergebnisse der Analyse in Tab. 7 zusammengefaßt. Wie aus der Analyse hervorging, ist erwartungsgemäß das

einzelne carboxamidomethylierte Peptid T19 nicht nachweisbar. Es eluiert sehr wahrscheinlich im Durchlauf, also zusammen mit den Verunreinigungen und den sehr kleinen Peptiden T2, T4, T14 und T16. Eine Analyse dieser Peakfraktion war nicht möglich, da durch die bevorzugte Ionisierung von Salzen etc. kein interpretierbares Massenspektrum erhalten wurde. In dem D/R/CM-Chromatogramm (Peak 8) und in dem CM/D-Chromatogramm (Peak 7) konnte eindeutig das Cys145 im Peptid als CMT17, also alkyliert, mit der kalkulierten Masse von 773,4 identifiziert werden (Abb. 48: D/R/CM, Peak 8; CM/D, Peak 7). Wie aus Abb. 48 (D/R/CM; Peak 8) weiter klar ersichtlich, liegen diese Peptide auch als Natriumaddukte (+Na) vor. Das alkylierte Thiol ist weiterhin auch in allen Oxidationsstufen sichtbar (+O, +2O). Die Analyse beider Peakfraktionen zeigt insgesamt zweifelsfrei, daß es sich um reine CMT17-Fraktionen handelt, die nicht durch andere Peptide kontaminiert sind. Die Intensitäten bei der Ionisierung und die Peakflächen in den Chromatogrammen differieren nicht signifikant, so daß demzufolge Cys145 als freies Thiol vorliegen muß. Es ergaben sich in beiden Analysen keine Hinweise auf eine Existenz des nicht carboxamidomethylierten Peptids. Die Identifizierung von Cys43 und Cys67 gestaltet sich etwas schwieriger. Die detektierten Peptide weisen partiell eine andere Masse auf, als die durch den Computer errechneten Massen der Peptide T5, T6, T8 und T9 erwarteten ließen. Die Schnittstellen von T5 und T6 bzw. von T8 und T9 liegen aber so dicht nebeneinander (siehe Abb. 47), daß neben den einzelnen Peptiden T6 und T9 auch immer die Peptide T5/6 und T8/9 generiert werden. Im Falle des Cys67 wird das Peptid T8/9 (Abb. 48, D/R/CM Peaks 1, 2, 3) bevorzugt gebildet. Während dabei wie erwartet in der D/R/CM-Analyse hauptsächlich das CMT8/9 gefunden wurde, zeigte sich anhand des CM/D-Chromatogramms, daß dieses Peptid eine Brücke zum Peptid T19 ausbildet (1486,6). Diese wird auch in oxidierte Form (1502,6) und als T6-T19 (1358,5) gefunden (Abb. 48 CM/D, Peak 1, 2, 3, 5). Daneben wurden noch geringe Mengen von CMT8/9 in nicht alkylierter und alkylierter Form detektiert (Abb. 48 CM/D, Peak 1). Diese sind im Vergleich zu der D/R/CM-Probe um den Faktor 50 verringert, und die Intensität der Disulfidbrücke T8/9-T19 weist einen vergleichbaren Wert zu



**Abb.48.** MALDI-MS der Cystein-haltigen Peakfraktionen aus der RP-HPLC (Abb. 47). Für das Spektrum Peak 1-12 (D/R/CM) bzw. Peak 1-11 (CM/D) wurden die entsprechenden Fraktionen gepoolt

**Tab.7.** Theoretische und experimentell ermittelte monoisotopische Massen der tryptischen Cystein-haltigen Peptide und deren mögliche Disulfidbrücken. Die rot markierten Disulfide charakterisieren die stabile intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cys67-Cys164.

Peptide mögliche Disulfidbrücken	theor. Masse [M+H] <sup>+</sup> / (Da)	D/R/CM [M+H] <sup>+</sup> / (Da)	CM/D [M+H] <sup>+</sup> / (Da)
T6	723,3	1398,6	1398,6
CMT6	780,3	i.d., 796,7	id., 796,3
T5/T6	851,4	-	-
CMT5/T6	908,4	908,4 906,6	906,4
T9	750,3	-	-
CMT9	807,3	807,4	id.
T8/T9	878,4	-	id.
CMT8/T9	935,4	935,4	id.
T17	716,4	-	-
CMT17	773,4	773,4	773,4
T19	611,2	-	-
CMT19	668,2	-	-
T6-T9	1470,6	-	1470,6
T6-T8/T9	1598,7	-	1598,8
T6-T17	1436,4	-	1436,5
T6-T19	1331,5	-	1331,6
T5/6-T9	1598,7	-	1598,6 1614,6
T5/6-T8/T9	1726,8	-	-
T5/6-T17	1564,8	-	-
T5/6-T19	1459,6	-	-
T9-T17	1463,7	-	1463,7
<b>T9-T19</b>	<b>1358,5</b>	-	<b>1358,5</b>
T8/T9-T17	1591,8	-	1591,8
<b>T8/T9-T19</b>	<b>1486,6</b>	-	<b>1486,6, 1502,6</b>
T17-T19	1324,6	-	1324,6

id., identifiziert; D, denaturiert; R, reduziert; CM, carboxamidomethyliert

CMT8/9 in der D/R/CM-Fraktion auf. Daraus folgt, daß zwischen Cys67 und Cys164 eine thermodynamisch stabile Brücke besteht. In beiden Analysen wurde ein Peptid mit der Masse 934,5 detektiert (Abb. 48 D/R/CM Peak 10, CM/D Peak 9). Dabei kann es sich nicht um CMT8/9 (935,5) handeln, da es, wie die RP-HPLC zeigt, deutlich hydrophober ist. Zudem ist die MALDI-MS-Technik sensitiv genug, um Peptide mit der Massendifferenz von 1 Da zu unterscheiden. Die Sequenzanalyse ergab, daß die Peakfraktionen 10 bzw. 9 in der RP-HPLC Fragmente des Peptids T11 mit der Sequenz SPHWGSTY repräsentieren. Die für dieses Peptidfragment errechnete Masse stimmt dabei exakt mit der experimentell ermittelten überein. Sehr interessante Ergebnisse zeigen die Peptididentifizierungen mit Cys43 (T6). Das Peptid besitzt die

erwartete monoisotopische Masse 780,3. Diese Masse wird aber durch das monoisotopische Muster von T12, einem sehr gut ionisierbarem Peptid, fast vollständig überdeckt (Abb. 48 D/R/CM: Peak 5, CM/D: Peak 4). Hier ist ab 780,3 in beiden Analysen lediglich ein kleiner Doppelpeak zu erkennen, so daß dies eine mögliche Existenz des carboxamidomethylierten T6 aufzeigt. Die Existenz dieses Peptids wird durch die Tatsache untermauert, daß bei 796,3 eine oxidierte Form detektiert wird, die eine Oxidation am Methionin oder am S-(carboxamidomethyl)cystein anzeigt. Um die Annahme abzusichern und um mögliche Modifizierungen an einzelnen cysteinhaltigen Peptiden analysieren zu können, wurden die einzelnen Peakfraktionen nach RP-HPLC durch N-terminale Sequenzierung näher analysiert. Wie sich dabei zeigte ist das Peptid T6 in beiden Peakfraktionen neben T12 und T13 enthalten. Des weiteren wurde in beiden Analysen auch das Peptid T5/T6 mit der Masse 908,4 detektiert (Abb. 51 D/R/CM: Peak 4, 6; CM/D: Peak 3). Die weitere detaillierte Analyse durch N-terminale Sequenzierung ergab, daß auch eine Peakfraktion mit der monoisotopischen Masse 1398,6 eindeutig dem Peptid T6 zugeordnet werden kann (Abb. 48 D/R/CM: Peak 11, CM/D: Peak 10). In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, daß an dem rekombinanten Modellprotein ein Chromophor vorhanden ist, so daß an diesem Peptid ein Chromophor gebunden sein könnte. Genauere Untersuchungen bezüglich dieser Modifizierung stehen noch aus. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen in beiden Analysen gut überein, so daß eine Verbrückung von Cys43 ausgeschlossen werden kann. Alle anderen Peptide wurden eindeutig identifiziert (Abb. 47). Wie schon zuvor in der Strategie kurz diskutiert, können bei einer schnellen und effizienten Alkylierung der freien Thiole thermodynamisch stabile Brücken detektiert werden. Normalerweise werden daneben auch immer alle anderen möglichen Verknüpfungen gefunden. Das hat prinzipiell zwei Gründe. Zum einen sind die Proteine meist nicht völlig homogen (z.B. mögliche unterschiedliche Disulfidverknüpfung des verwendeten Standards aufgrund von intrazellulären Kontaminationen bedingt durch die Lyse der Zellen). Zum anderen stellt die Chemie bzw. die Alkylierung der freien Thiole ein großes Problem bei der Identifizierung stabiler Disulfidbrücken dar. Freie Thiolgruppen reagieren mit

Iodacetamid mit einer Geschwindigkeitskonstante von ca  $2 - 16 \text{ sec}^{-1} \text{ l mol}^{-1}$ , was bei einer Endkonzentration von  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  einer Halbwertszeit von  $0,4 - 3 \text{ s}$  entspricht (Creighton, 1975, 1984). Das heißt, die Reaktion verläuft auch bei sehr hohen Iodacetamidkonzentrationen nicht augenblicklich, so daß es zum Austausch von Disulfiden kommen kann und so andere Intermediate (Disulfide) durch die Alkylierungsprozedur erst generiert werden. In Falle des  $\beta$ -TP wurden dabei in geringem Maße fast alle möglichen Kombinationen von Disulfidbrücken durch die sehr empfindliche MALDI/TOF-MS Analyse detektiert (Tab. 7), die, wie zuvor diskutiert sehr wahrscheinlich Artefakte, hervorgerufen durch die verwendete Chemie, darstellen. In keiner der analysierten Proben ergaben sich Hinweise auf ein gemischtes Disulfid (Protein-S-S-Glutathion).

### **Zusammenfassung**

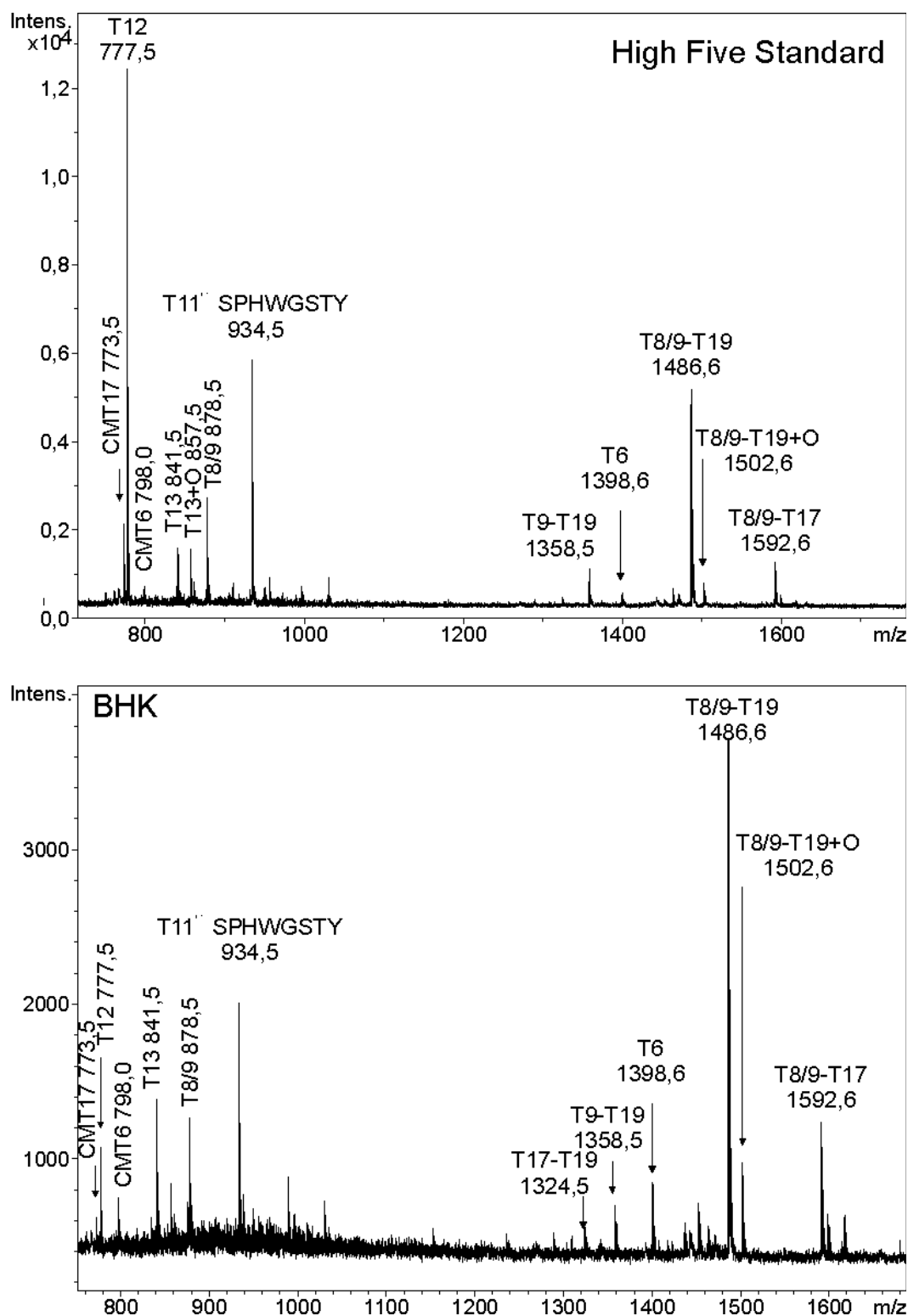
Zusammenfassend läßt sich aus den Ergebnissen schließen, daß zwischen Cys67-Cys164 eine intramolekulare Disulfidgruppe besteht, während die Cysteine Cys43 (T6, T5/6) Cys145 als freie Thiole vorliegen.

#### **3.4.9.3 Analyse des intrazellulären Thiol/Disulfidbrückenstatus des $\beta$ -TPs**

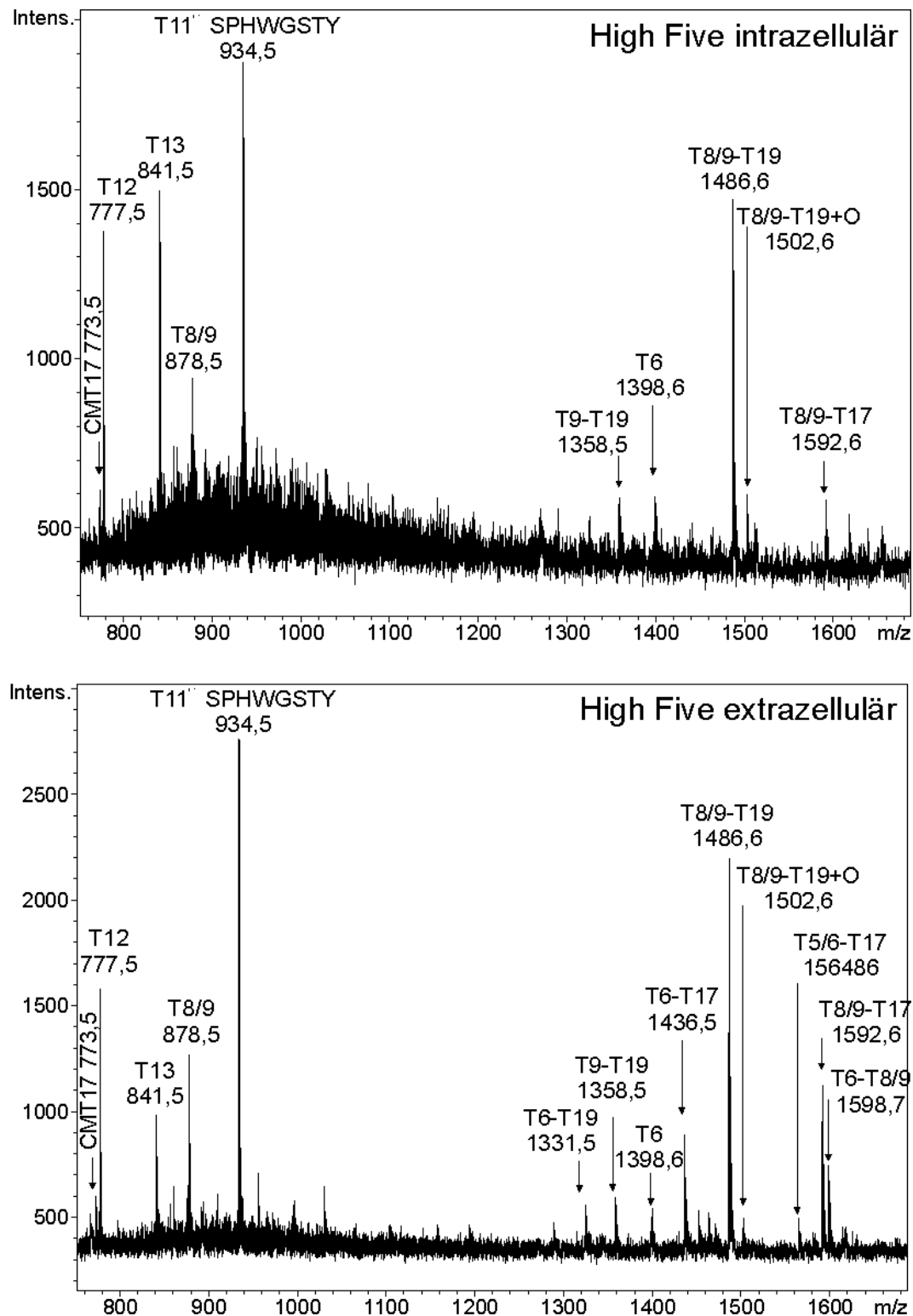
In den gepoolten MALDI/TOF-MS-Spektren ergaben sich keine signifikanten qualitativen Unterschiede bezüglich der detektierten cysteinhaltigen Peptide, so daß die weitere Analyse des Disulfidbrückenstatus des intra- und extrazellulären  $\beta$ -TP aus Insektenzellen durch Poolen der ersten 11 Peakfraktionen anhand der tryptischen *maps* erfolgte. Um die zuvor erhaltenen Ergebnisse abzusichern, wurde die Analyse auch mit  $\beta$ -TP aus rekombinanten BHK-21 Zellen durchgeführt. Das konstitutiv sekretorische  $\beta$ -TP aus diesen Zellen ist homogen, da kaum intrazellulären Formen, wie bei Insektenzellen nach Baculovirusinfektion möglich, in den Überstand gelangen können. Die Analyse des intra- und extrazellulären Disulfidbrückenstatus des  $\beta$ -TP aus Insektenzellen erfolgte mit dem zuvor für die Glycosylierungsanalytik generierten Protein (Abb. 37). Zusätzlich wurde als Kontrolle der Standard aus High Five mitgeführt. Für die Analyse wurden jeweils  $1 \text{ mg}$   $\beta$ -TP carboxamidomethyliert



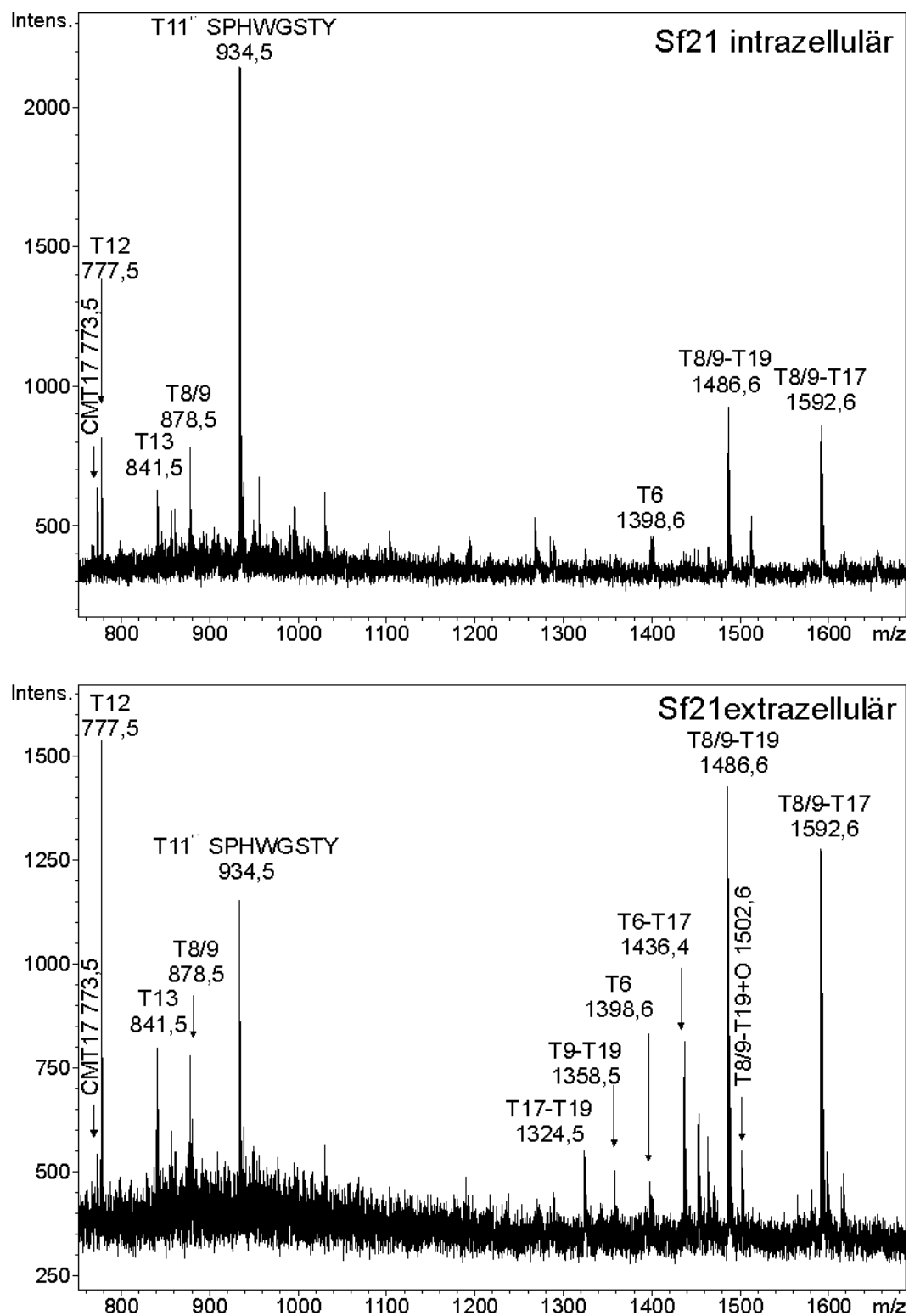
/denaturiert (CM/D), tryptisch verdaut, eine RP-HPLC durchgeführt und die gepoolten Fraktionen durch MALDI/TOF-MS untersucht (Abb. 49-51). Wie aus den Analysen des Standards aus High Five in Abb. 48 CMD/Peak 1-11 bzw. Abb. 49 hervorgeht, bestehen hinsichtlich des Thiolstatus in beiden Analysen keine signifikanten Unterschiede, so daß die Qualität der Alkylierung in beiden Analysen gleich ist. In beiden unabhängig voneinander analysierten Proben zeigt sich, daß zwischen Cys67 und Cys164 die Disulfidbrücke besteht (T9-T19, T8/9-T19, T8/9-T19+O). Neben den anderen detektierbaren Disulfidbrücken sind dabei immer besonders gut Verbrückungen zwischen Cys67 und Cys164 detektierbar (T8/9-T17). Aufgrund der oben diskutierten Gründe (siehe 3.4.9.2.) handelt es sich dabei aber nicht um native Disulfidbrücken sondern um Artefakte, die durch die Alkylierung entstanden sind. Interessanterweise ist in allen analysierten Proben das nicht alkylierte Peptid T8/9 in geringen Mengen im Vergleich zu ihrer Verbrückung mit T19 nachweisbar. Die Herkunft kann nicht genau geklärt werden, es ist aber allgemein bekannt, daß es durch die Ionisierung bei der MALDI zu Fragmentierungen von Disulfidbrücken kommt (Patterson und Katta, 1994). In dem Massenbereich des dazugehörigen verbrückten Peptids (T19) ist das Spektrum wegen Kontaminationen durch Matrixbestandteile etc. in diesem Bereich verunreinigt und kann dadurch nicht ausgewertet werden. Cys145 und Cys43 werden in beiden Proben alkyliert (CMT17) und im Falle von T6 wird auch wieder die ungewöhnliche Masse 1398,6 nachgewiesen. Der *Fingerprint* der Analyse des  $\beta$ -TP aus BHK-Zellen zeigt ein sehr ähnliches Bild und bestätigt damit die zuvor erhaltenen Ergebnisse, die durch den Standard aus High Five erhalten wurden (Abb. 50). Die Analyse des intra- und extrazellulären  $\beta$ -TP aus High Five zeigt jeweils einen ähnlichen *fingerprint* im Vergleich zum Standard und zum  $\beta$ -TP aus BHK-Zellen (Abb. 49). Bei Sf21-Zellen (Abb. 51) scheint das Protein an sich viel inhomogener zu sein, da die Verbrückungen T17-T19, T6-T17 und T8/9-T17 relativ stark im Vergleich zu den anderen MALDI/TOF-MS-Analysen sichtbar sind. In beiden Zelllinien kann aber eindeutig festgehalten werden, daß sich die MALDI-Spektren der intra- und extrazellulären Formen des  $\beta$ -TP nicht unterscheiden.



**Abb.49.** Disulfidbrückenanalytik des  $\beta$ -TP aus dem Standard aus High Five (oben) und des  $\beta$ -TP aus BHK-Zellen (unten). Das Protein wurde carboxamidomethyliert, denaturiert, tryptisch gespalten und eine RP-HPLC durchgeführt. Die ersten 11 Fraktionen wurden gepoolt und durch MALDI-MS analysiert.



**Abb.50.** Disulfidbrückenanalytik des  $\beta$ -TP aus Insektenzellen. Intra- und extrazelluläres  $\beta$ -TP aus High Five wurde carboxamidomethyliert, denaturiert, tryptisch gespalten und über eine  $C_{18}$ -Säule chromatographisch getrennt. Die ersten 11 Fraktionen wurden dann gepoolt und durch MALDI-MS analysiert.



**Abb.51.** Disulfidbrückenanalytik des  $\beta$ -TP aus Insektenzellen. Intra- und extrazelluläres  $\beta$ -TP aus Sf21 wurde carboxamidomethyliert, denaturiert, tryptisch gespalten und über eine  $C_{18}$ -Säule chromatographisch getrennt. Die ersten 11 Fraktionen wurden dann gepoolt und durch MALDI-MS analysiert.

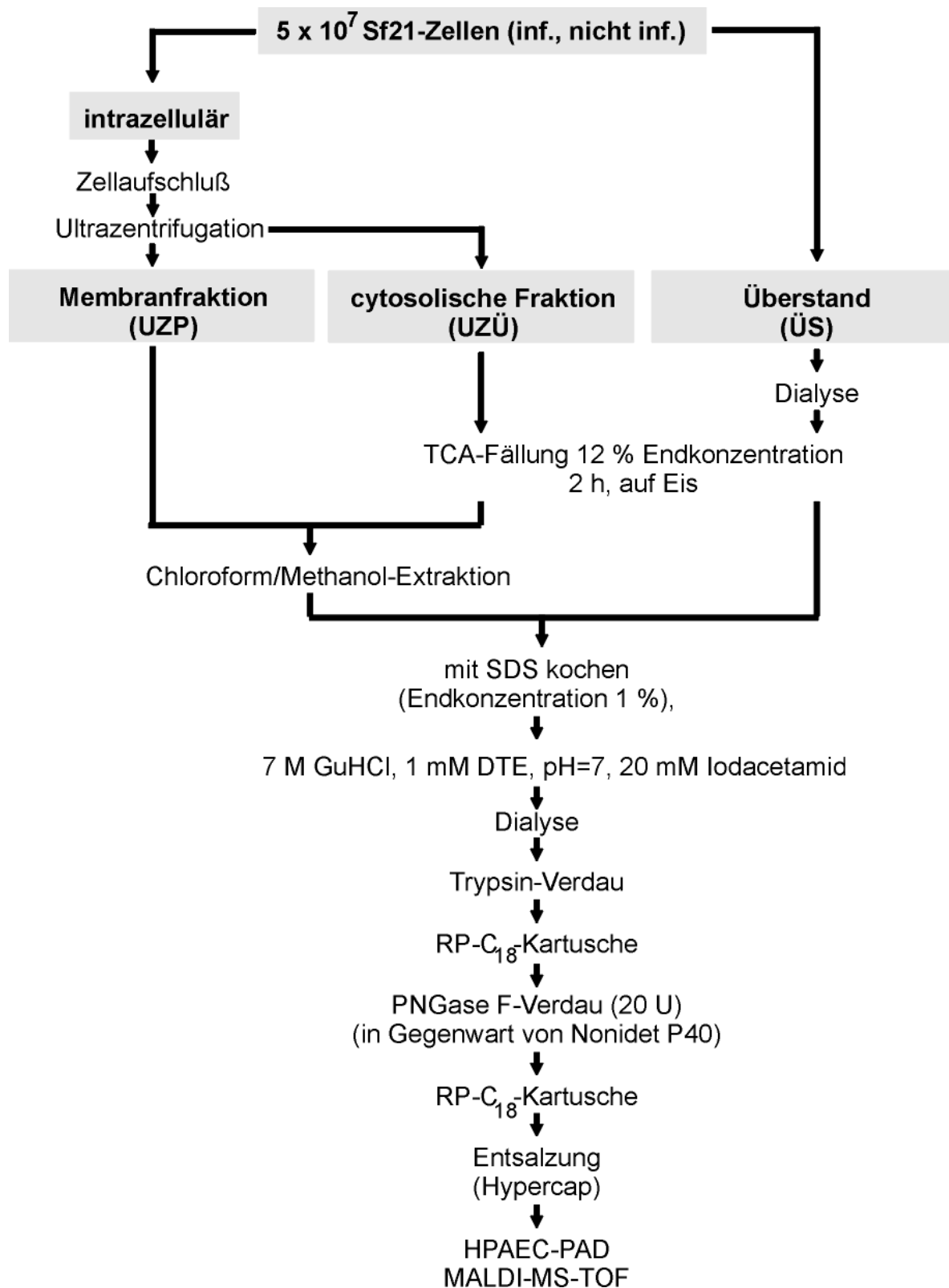
Damit zeigt sich, daß eine fehlerhafte Disulfidbrückenbildung nicht für die intrazelluläre Akkumulation bzw. Retention des gewählten Modellproteins verantwortlich ist.

### **Zusammenfassung**

S      Zwischen den intra- und extrazellulären Formen des  $\beta$ -TP aus Insektenzellen bestehen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Thiol/Disulfid-status. In den intra- und extrazellulär Proben besitzt das rekombinante Modellprotein eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cys67-Cys164 (T8/9-T19). Daraus läßt sich schlußfolgern, daß einer der wesentlichen ko- und posttranslationalen Prozesse der Proteinfaltung, die Disulfidbrückenbildung, nicht für die Akkumulation des rekombinanten Modellproteins verantwortlich ist.

#### **3.4.10. Zelleigene N-Glycanstrukturen infizierter und nicht infizierter Sf21 Zellen**

Aussagen über die Glycosylierungskapazität von Insektenzellen sind im Wesentlichen durch die Akkumulation von Daten verschiedener rekombinanter Proteine erhalten worden. Modellproteine wie das in der vorliegenden Arbeit verwendete  $\beta$ -TP liefern wertvolle Daten bezüglich der N-Glycosylierungskapazität, da die Synthese bestimmter N-Glycane durch das Protein selbst determiniert ist und unabhängig von der verwendeten Wirtszelle erfolgt (*site-specificity*). Um zu überprüfen, ob Insektenzellen zelleigene Proteine anders glycosylieren als Baculovirus-exprimierte rekombinante Proteine wurden die Gesamt-N-Glycane von infizierten und nicht infizierten Sf21 Zellen analysiert. Dazu wurden die Zellbestandteile nach dem Zellaufschluß (siehe 2.6.) wie unter 2.7.2. beschrieben in die cytosolische (UZÜ)- und Membranfraktion (UZP) sowie in den Überstand getrennt. Die Strategie der Isolierung der N-Glycane ist in Abbildung 52 dargestellt. Wie daraus hervorgeht, wurde der Überstand zunächst zur Abtrennung der bei der TCA-Fällung störenden Substanzen dialysiert. Nach der TCA-Fällung erfolgte sowohl bei der Membran- als auch bei der cytosolischen Fraktion ein Chloroform/Methanol-Extraktionsschritt zur Abtrennung von Lipiden. Die Pellets wurden in 1 % SDS und 7 M GuHCl denaturiert, mit 1 mM DTE reduziert und



**Abb.52.** Schema zur Isolierung der Gesamt-N-Glycane aus infizierten und nicht infizierten Sf21 Zellen.

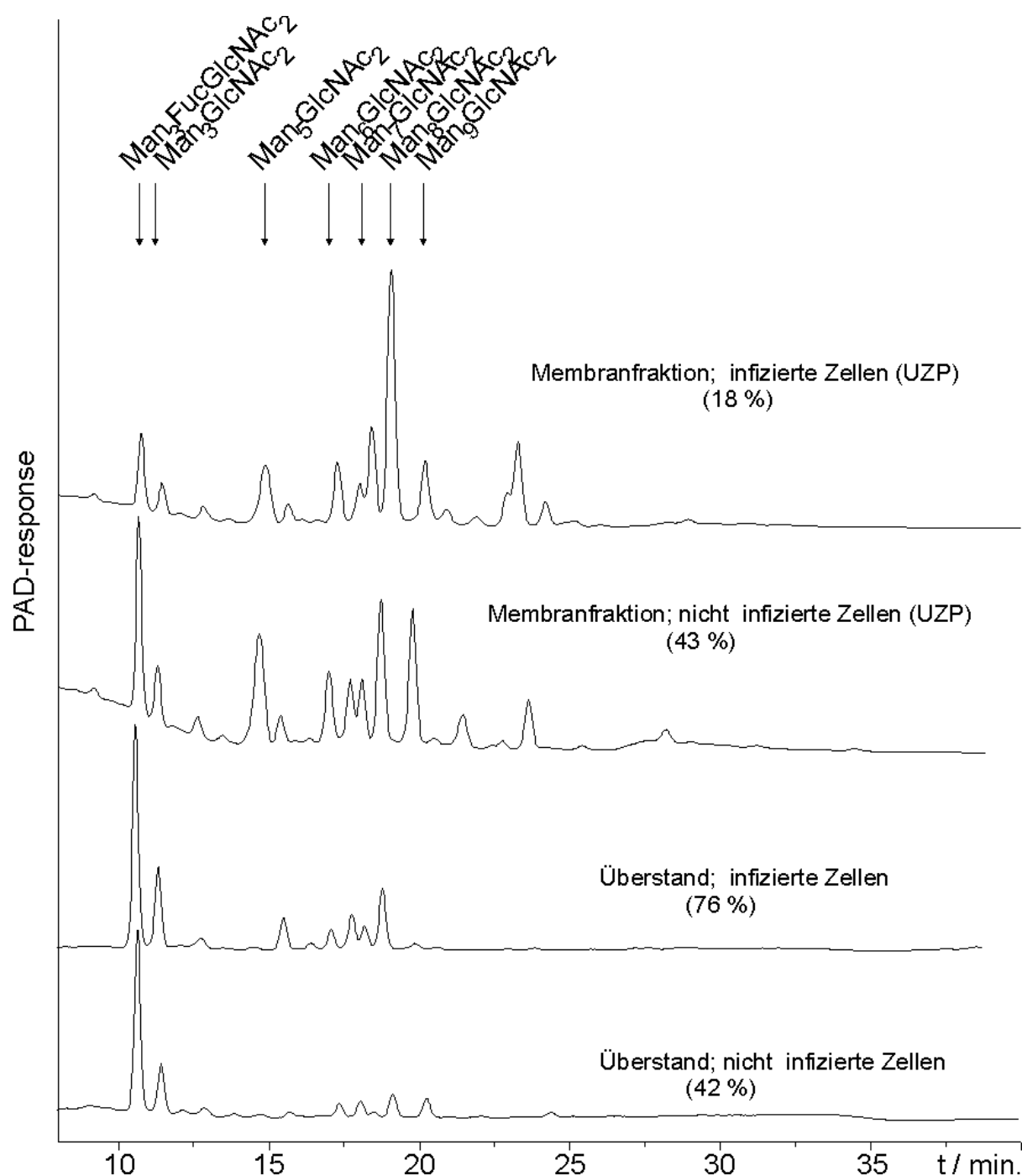
anschließend alkyliert. Nach einem weiteren Dialyseschritt wurden die Lösungen auf eine SDS-Endkonzentration von 0,1 % verdünnt und für 28 h mit 7 % (w/v) Trypsin verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden über eine RP-C<sub>18</sub>-Kartusche gereinigt. Danach erfolgte die enzymatische Trennung der Glycane von den Peptiden durch jeweils 30 U PNGase F in Gegenwart von 0,5 % Nonidet P-40. Die Majorität der Peptide wurde über eine RP-C<sub>18</sub>-Kartusche entfernt. Nach der Entsalzung wurden die isolierten N-Glycane durch HPAEC-PAD und MALDI/TOF-MS detailliert untersucht. Die Analyse ergab, daß der Anteil der N-Glycane der cytosolischen Fraktionen an den Gesamt-N-Glycanstrukturen nur 6 % (in infizierten Sf21 Zellen) und 15 % (in nicht infizierten Sf21 Zellen) beträgt, so daß im weiteren Verlauf der Untersuchungen die Membranfraktionen (UZP) und die Zellüberstände untersucht wurden. In Abbildung 53 sind die HPAEC-PAD-Chromatogramme der einzelnen untersuchten Fraktionen dargestellt. Als Standards dienten wiederum Man<sub>3</sub>Fuc<sub>0-1</sub>GlcNAc<sub>2</sub> und Man<sub>5-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Die relativen Häufigkeiten der anderen Fraktionen sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

**Tab.8.** Gesamt-N-Glycane aus Sf21-Zellen.

N-Glycan	Membranfraktion (UZP)		Überstand (ÜS)	
	inf.	n.inf.	inf.	n.inf.
	relative Häufigkeit (%)			
Man <sub>3</sub> FucGlcNAc <sub>2</sub>	11	24	47	57
Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	4	7	18	16
Man <sub>5</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	3	4	8	2
Man <sub>6</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	11	11	4	4,5
Man <sub>7</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	14	11	8	5,5
Man <sub>8</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	46	22	13,5	8
Man <sub>9</sub> GN <sub>2</sub>	11	21	1,5	7
GlcMan <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub>		id.		
(Neu) <sub>1-3</sub> (GalGlcNAcMan) <sub>3</sub> GlcNAc			i.d.	

Man, Mannose; Fuc, Fucose; GlcNAc, N-Acetylglucosamin; Glc, Glucose; Neu, Neuraminsäure; Gal, Galactose; id., identifiziert

In den Überständen nicht infizierter Insektenzellen als auch infizierter Insektenzellen werden die gleichen N-Glycane mit den Hauptstrukturen Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> und Man<sub>3</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> detektiert. Das Ergebnis der Gesamt-N-Glycan-Analyse deckt sich mit den gefundenen Strukturen des Modellproteins β-TP.



**Abb.53.** HPAEC-PAD der N-Glycane aus Sf21 Zellen. Die intrazelluläre Fraktion wurde nach dem Zellaufschluß durch Ultrazentrifugation bei 100000 g in die cytosolische und Membranfraktion separiert. Die in den Klammern angegebenen Zahlen kennzeichnen den prozentualen Anteil der N-Glycanstrukturen der jeweiligen Fraktion an den detektierten Gesamt-N-Glycanstrukturen. Der Anteil der N-Glycane der cytosolischen Fraktionen an den Gesamt-N-Glycanen in Sf21 Zellen beträgt 6 % (in infizierten Zellen) und 15 % (in nicht infizierten Zellen) und wurde daher nicht näher untersucht.



Interessanterweise wurden im Überstand der infizierten Probe in den Massenspektren die triantennären Glycane  $\text{NeuAc}_{1-3}(\text{GalGlcNAcMan})_3\text{GlcNAc}_2$  nachgewiesen. Diese Glycane waren in der Membranfraktion nicht vorhanden. Daraus läßt sich schließen, daß diese Strukturen nicht durch Insektenzellen nach Baculovirusinfektion gebildet worden sind, sondern vielmehr von der mit dem Virusstock eingebrachten Kontamination durch FCS (Endkonzentration 0,1 % FCS) herrühren. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die Analyse der Gesamt-N-Glycane nicht infizierter Zellen. In beiden Fraktionen (Überstand und Membranfraktion) konnten diese Glycane durch die sehr sensitiven massenspektrometrischen Verfahren nicht nachgewiesen werden.

Wie die Ergebnisse der Analyse der Gesamt-N-Glycane aus infizierten und nicht infizierten Sf21 Zellen weiter zeigen, bestehen hinsichtlich der Glycosylierungskapazität keine qualitative Unterschiede. Durch die Infektion verschieben sich aber die relativen Verhältnisse von den oligomannosidischen Strukturen zu den paucimannosidischen Strukturen sowohl in Membranfraktionen als auch in den Überständen. So steigt der Anteil der oligomannosidischen Strukturen nach Baculovirusinfektion in der Membranfraktion von 69 % auf 85 %, wobei das Oligosaccharid  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  das Haupt-N-Glycan darstellt (46 %). Dies steht im Einklang mit der Analyse der N-Glycane des rekombinanten Modellproteins  $\beta$ -TP aus infizierten Insektenzellen. Es zeigt sich demnach auch auf der Ebene der Analyse der Gesamt-N-Glycane, daß durch die Baculovirusinfektion die Prozessierung der Glycosylierungsintermediate verlangsamt wird.

In nicht infizierten und auch in infizierten Zellen konnten neben den detektierten paucimannosidischen Strukturen und *high-mannose-type* Formen auch die Glycane  $\text{GlcNAcMan}_{3-4}\text{F}_{0-1}\text{GlcNAc}_2$  identifiziert werden, die zuvor auch bei der Analyse der Glycanen des  $\beta$ -TP detektiert wurden. Die Menge an diesen Strukturen ist dabei wie bei dem zuvor untersuchten Modellprotein äußerst gering. Wie aus den Daten eindeutig hervorgeht, werden von Insekten zelleigene Proteine nicht anders glycosyliert als Baculovirus-exprimierte rekombinante Proteine. Lepidopteren besitzen demnach generell nicht die Fähigkeit zur Ausbildung von *complex-type* Strukturen.

Wie zuvor bei der Analyse der N-Glycane des  $\beta$ -TP aus Insektenzellen beschrieben betrug der relative Anteil der  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  zwischen 1,5 und 5 %. Dies steht auch im Einklang mit den hier gefundenen Werten der Gesamt-N-Glycane infizierter Zellen. Bei nicht infizierten Zellen ist der Anteil an  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  deutlich erhöht. Des weiteren wurden in diesen Proben durch Massenspektrometrie eindeutig  $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$  nachgewiesen.

### **Zusammenfassung**

- S     Wie mit der Analyse der Gesamt-N-Glycane eindeutig gezeigt werden konnte, werden zelleigene Proteine von Insektenzellen mit den gleichen Oligosaccharidstrukturen modifiziert wie Baculovirus-exprimierte rekombinante Proteine.
- S     Durch die Infektion ändert sich das Glycosylierungsmuster, was sich in einer Erhöhung der oligomannosidischen Strukturen zweifelsfrei zeigt. Die erhaltenen Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Analyse der N-Glycane des rekombinanten Modellproteins  $\beta$ -TP.

## 4. Allgemeine Diskussion

Das Baculovirus-Expressionssystem stellt das zur Zeit wohl prominenteste transiente Expressionssystem dar und hat aufgrund seiner einfachen Handhabung und des geringen Zeitaufwandes, der benötigt wird, um mehrere hundert mg eines gewünschten Proteins zu produzieren, eine sehr große Verbreitung gefunden. Die intrazelluläre Akkumulation von großen Anteilen der jeweilig exprimierten rekombinanten Proteine, die zwischen 50 % und 90 % betragen, stellt dabei ein häufig beobachtetes Problem bei der Verwendung dieses Expressionssystems dar. So berichten beispielsweise Jarvis et al. (1990), daß nach einem Puls ( $^{35}\text{S}$ -Methionin) von 5 min nach 24 h chase noch 50 % des markierten rekombinanten t-PA stabil mit den Zellen assoziiert waren. Den gleichen relativen Anteil ermittelten Sissom und Ellis (1991) nach Expression des humanen Insulinrezeptors. Grabenhorst (1994) zeigte, daß bei der Expression von IL-2 in Sf21 Zellen etwa 75 % des insgesamt gebildeten Proteins während der gesamten Infektionsphase stabil mit den Zellen assoziiert bleiben. Daß die Akkumulation rekombinanter Proteine nicht ausschließlich auf sekretorische Proteine beschränkt ist zeigt die Arbeit von Xie et al. (1992), die in Sf9 Zellen einen cytosolischen Androgenrezeptor exprimierten. Sie berichten, daß 90 % des gebildeten Rezeptors mit unlöslichen Zellbestandteilen assoziiert ist. Auch Alnemri und Litwack (1993) analysierten, daß nach Expression humaner Mineralcorticoid- und Glucocorticoidrezeptoren weniger als 1 % als cytoplasmatische, oligomere Rezeptorkomplexe vorlagen, während die Hauptmenge der gebildeten Rezeptoren als unlösliche Formen detektiert wurden. Bei dem Phänomen der Produktakkumulation rekombinanter Proteine unter dem Polyhedrinpromotor in Baculovirus-infizierten Insektenzellen handelt es sich demzufolge um ein generelles Problem dieses Expressionssystems. Wie in der einführenden Charakterisierung der Produktakkumulation des verwendeten Modellproteins  $\beta$ -Trace Protein ( $\beta$ -TP) durch *western blotting* gezeigt werden konnte bleiben etwa 50 % des gebildeten rekombinanten Proteins stabil mit den Zellen über den gesamten Infektionsverlauf assoziiert. Dieser Wert steht damit in Einklang mit den oben diskutierten Literaturdaten

zur Expression verschiedener rekombinanter Proteine in Insektenzellen. Daraus ergibt sich, daß auch durch die Expression des konstitutiv sekretorischen  $\beta$ -TP in Baculovirus-infizierten Insektenzellen das Phänomen der Produktakkumulation rekombinanter Proteine beschrieben werden kann. Nach gängiger Lehrmeinung (siehe 1.6., Biosynthese von sekretorischen Proteinen) beinhaltet die Biosynthese konstitutiv sekretorischer Proteine eine sequentielle Prozessierung und einen regulierten Transport durch die morphologisch distinkten Transportkompartimenten des Sekretionsweges, wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER), dem cis-, medial- und trans-Golgiapparat und dem trans-Golgi Netzwerk (TGN). Eine Vorbedingung für diese regulierten Vorgänge inklusive einer effizienten Qualitätskontrolle ist eine intakte Kompartimentierung der Zellen. Die Qualitätskontrolle beinhaltet so wichtige Kontrollmechanismen wie die Zurückhaltung von falsch gefalteten Proteinen im ER, die ER-assoziierte Degradation und das Zurückholen von Proteinen in das ER aus „*Downstream*“ Kompartimenten (Ellgaard et al., 1999, Wickner et al., 1999). Bedingt durch die Baculovirusinfektion war es vorstellbar, daß die intrazelluläre Kompartimentierung gestört wird, wodurch dann Engpässe des Sekretionsweges entstehen und eine effiziente Qualitätskontrolle nicht mehr möglich ist. Ein ideales Protein für die Analyse solcher Engpässe bzw. für die Untersuchung der Akkumulation rekombinanter Proteine in Baculovirus-infizierten Insektenzellen ist das  $\beta$ -Trace Protein ( $\beta$ -TP), da es sich um ein konstitutiv sekretorisches Glycoprotein handelt, bei dem man durch detaillierte Analyse der ausgeführten ko- und posttranslationalen Modifikationen wie der Signalpeptidabspaltung, der Bildung von Disulfidbrücken und der N-Glycosylierung auf mögliche Ursachen für die Akkumulation des  $\beta$ -TP schließen kann. Für die Untersuchung des Akkumulationsphänomens wurde zunächst die intrazelluläre Kompartimentierung von infizierten und nicht infizierten Insektenzellen und die Produktbildung auf morphologischer Ebene untersucht. Um die Biosynthese des  $\beta$ -TP in infizierten Insektenzellen und damit die intrazelluläre Akkumulation dieses Modellproteins in diesen Zellen zu verstehen, schlossen sich detaillierte biochemische Untersuchungen hinsichtlich der Kinetik der Produktbildung und Sekretion des  $\beta$ -TP

an. Auf molekularer Ebene sollten dann mögliche Engpässe des Sekretionsweges durch Analyse der ko- und posttranslational ausgeführten Modifikationen des  $\beta$ -TP (s.o.) mit den modernen komplementären chromatographischen und massenspektrometrischen *Mapping*-Verfahren (HPAEC-PAD, MALDI/TOF-MS, ESI-MS, ESI-MS-MS) und durch N-terminale Sequenzanalyse lokalisiert werden.

#### **4.1. Mikroskopische Untersuchungen der intrazellulären Kompartimentierung nicht infizierter und infizierter Insektenzellen und Kinetik der Produktbildung des $\beta$ -TPs**

In nicht infizierten Sf21 und High Five Insektenzellen konnten eindeutig die Kompartimente des Sekretionsweges wie das endoplasmatische Reticulum (ER) und der Golgi-Apparat durch elektronenmikroskopische Untersuchungen identifiziert werden (Abb. 12a, b). Man sieht das ER mit vielen kleinen mit Ribosomen gebundenen Vesikeln. Da in der erste Phase der Infektion, der BV-Phase, die *very-late* Gene kaum exprimiert werden, wurde hier entschieden, infizierte Zellen erst ab 20 h zu untersuchen. Wie aus den Schnitten der High Five Zellen in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen hervorgeht, sind zu diesem Zeitpunkt die charakteristischen Kernstrukturen der ODV-Phase bereits voll ausgebildet. So ist das virogene Stroma schon in seine reife, gitterartige Struktur kondensiert (*chromatic mass*) und auch das peristromale Kompartiment, die Ringzone mit den darin akkumulierenden ODVs, ist voll ausgeprägt (Abb. 13). Bei Sf21 Zellen sind diese Strukturen jedoch nicht sichtbar. In Sf21 Zellen scheinen über den gesamten Infektionsverlauf BVs oder Progenitor-Viren produziert zu werden, wie die morphologischen Studien der Baculovirusinfektion in diesen Zellen belegen. Das könnte eine Erklärung dafür sein, daß bei der Herstellung von Virusstocks in Sf21 oder Sf9 Zellen immer um eine Größenordnung höhere Titer erreicht werden. Gemein ist beiden verwendeten Zelllinien aber die Bildung von kernständigen fibrillären p10-Körpern in dieser Phase (Abb. 14a). Die cytoplasmatischen Strukturen bzw. Kompartimente bleiben in beiden Zellen in der Übergangsphase erhalten und das

rekombinante Modellprotein ist ab 20 h identifizierbar. Es ist dabei wie erwartet im ER und Golgi lokalisiert (Abb. 15). Die Menge ist, wie die Immunogoldmarkierung belegt, aufgrund der erst jetzt einsetzenden Produktion des Modellproteins noch sehr gering. Wie die zu späteren Zeitpunkten angefertigten Schnitte zeigen, werden in der dritten Phase, der ODV-Phase, die cytoplasmatischen Strukturen umgeordnet. Es verändert sich das gesamte Cytoskelett und das Endosomale System (Charlton und Volkmann, 1993). Des weiteren entwickeln sich auch hier fibrilläre Strukturen, die p10-Körper, die im Verlauf der Infektion Ausdehnungen von bis zu 15 µm einnehmen können (Abb. 14c). Wie Volkmann und Zaal (1990) berichteten, sind diese Strukturen mit den Mikrotubuli assoziiert, sind aber nach der Auffassung der Autoren nicht die Ursache für die Änderungen des Cytoskeletts. Funktionell ist sehr wenig über diese p10-Körper, die auch im Kern lokalisiert sind, bekannt. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang eine mögliche Funktion als Mikrotubulus-Assoziations-Protein (MAP), ähnlich dem MAP > (tau) (Noble et al., 1989). Bei diesem Protein wurde nachgewiesen, daß es einen stark basischen C-Terminus besitzt, der phosphoryliert und dephosphoryliert werden kann und so die Assoziation bzw. Dissoziation von den Mikrotubuli vermittelt. Dieser stark basische C-Terminus mit der Eigenschaft der Phosphorylierung und Dephosphorylierung wurde auch bei dem p10-Protein nachgewiesen (Cheley et al., 1992), weswegen die Autoren auf eine MAP-Funktion dieses Proteins schließen. Die Entstehung der cytoplasmatischen p10-Körper korreliert mit dem Verlust distinkter Zellkompartimente. Auch nach der Analyse vieler Einzelschnitte war es nicht möglich rauhe ER-Vesikel oder einen Golgi zu lokalisieren. Das β-TP ist in dieser Infektionsphase zunächst in kleinen Vesikeln lokalisiert, die in zwei morphologisch verschiedenen Formen, einer elektronendichten (DV) und einer elektronen-durchlässigen (LV) Form erscheinen (Abb. 16). Im weiteren Verlauf der Infektion erscheinen diese Strukturen vergrößert (Abb. 17, 18), was darauf hindeutet, daß sie aus Fusionen der kleineren Strukturen hervorgegangen sind. Diese scheinen weiter zu fusionieren und bilden Megavesikel (Abb. 19, 20). Es ist dabei nicht klar, ob das in diesen Strukturen akkumulierte rekombinante Protein erst nach erfolgter Zellyse,

bedingt durch den lytischen Zyklus der Infektion, aus den Zellen in den Überstand gelangt oder ob diese Megavesikel auch mit der Plasmamembran fusionieren können und so das rekombinante Protein in den Überstand abgeben können (Abb. 20). Zweifelsfrei läßt sich jedoch feststellen, daß es sich dann nicht mehr um eine konstitutive Sekretion handeln kann. Die in der vorgelegten Arbeit durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen belegen, daß sich durch den Infektionsprozeß oder genauer während der ODV-Phase verschiedene intrazelluläre Kompartimente auflösen oder verschmelzen. Detaillierte Untersuchungen zu diesem Thema sind bisher von keiner Arbeitsgruppe vorgelegt worden. Lediglich Grabenhorst (1994) vermutete, daß durch den Infektionsprozeß die intrazelluläre Kompartimentierung gestört wird. Diese Vermutung stützte sich auf erste Untersuchungen des Akkumulationsphänomens durch Charakterisierung der Produktbildung von rekombinantem IL2 in Sf21 Zellen. Er konnte zeigen, daß ca. 75 % der insgesamt exprimierten rekombinanten IL2-Proteine während der gesamten Infektionsphase mit den Zellen assoziiert blieben (s.o.). Wie er nachweisen konnte war die Aggregatbildung ab 24 h bereits manifestiert. Er interpretierte das als einen Hinweis darauf, daß die intrazelluläre Kompartimentierung und der gerichtete Transport gestört sind, so daß das exprimierte Protein schlechter sekretiert wird. Durch die hier gezeigten elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte erstmals bewiesen werden, daß das Phänomen der Produktakkumulation rekombinanter Proteine in Baculovirus-infizierten Insektenzellen eng an den Replikationszyklus des Virus gebunden ist. So scheint es in diesem Zusammenhang auch sehr unwahrscheinlich, daß die Akkumulation des rekombinanten Modellproteins  $\beta$ -TP eine Folge der Überexpression ist, da die Auflösung bzw. die Verschmelzung der distinkten Zellkompartimente schon zu einem Zeitpunkt erfolgt, wo das  $\beta$ -TP noch nicht überexprimiert wird.

Durch Markierungen mit kompartimentspezifischen Antikörpern wurde der Frage nachgegangen, ob die vesikulären Strukturen einem definierten Kompartiment zugeordnet werden können. Da für diese Untersuchungen keine kompartiment-

spezifischen Antikörper für Insektenzellen kommerziell erhältlich sind, wurden die für Säugerzellen spezifischen Antikörper BiP (*heavy chain binding* Protein), PDI (Protein-Disulfid-Isomerase), Calnexin und Calreticulin (alle ER-spezifisch) und die Antikörper gegen das Golgi 58k- und das TGN38-Protein (Trans-Golgi-Network) getestet. Diese zeigten mit nicht infizierten und infizierten Insektenzellen keine spezifischen Bindungen. Auf eine aufwendige Herstellung insektenspezifischer Antikörper des Sekretionsapparates wurde verzichtet, denn unter der allgemeinen Annahme, daß die sequentiellen Schritte der N-Glycosylierung in distinkten Kompartimenten erfolgen und demzufolge die N-Glycanstrukturen des Proteins den Lokus des Proteins anzeigen, können alternativ und sehr viel genauer Engpässe auf dem Weg der Prozessierung durch die Analyse der N-Glycanstrukturen lokalisiert werden.

#### **4.2. Biosynthese und Sekretion des $\beta$ -TP in Insektenzellen**

Eine Verbindung des Akkumulationsphänomens mit dem Replikationszyklus konnte auch durch Analyse der Biosynthese des  $\beta$ -TP mittels *western blotting* zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. zweifelsfrei nachgewiesen werden. So bestehen zu Beginn der Produktexpression, in dem sehr kurzen Zeitintervall in der Übergangsphase von der BV- zur ODV-Phase (20 h), intrazellulär deutliche qualitative Unterschiede hinsichtlich der erhaltenen Proteinbanden im Western Blot im Vergleich zur darauffolgenden Produktionsphase (ODV-Phase). Das Bandenmuster ist in der ersten Phase der Produktexpression (Übergangsphase) identisch mit dem Bandenmuster des in das Medium sekretierten Proteins (Abb. 27, 28). Dies spricht für einen effizient geregelten Transport und eine reguläre Glycoproteinprozessierung, weil sich eine Veränderung der Glycosylierung im Molekulargewicht manifestieren würde. Untermuert wird dies durch die in der vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung, daß in diesem Zeitfenster die intrazelluläre Kompartimentierung der infizierten Zellen noch intakt ist (siehe 4.1.). Im weiteren Verlauf der Infektion, mit der Etablierung der ODV-Phase, werden drei neue Proteinbanden im Western Blot detektiert (Bande 4, 28 kDa; Bande 5, 25 kDa; Bande 6, 22 kDa). Dieses Bandenmuster bleibt dann über die



gesamte Produktionsphase konstant und akkumuliert gleichmäßig. Im Western Blot des intrazellulären  $\beta$ -TP Proteins, vor und nach Reduktion (Abb. 23) besitzen die Proteinformen der Banden 4 und 5 ein unterschiedliches Laufverhalten. Das zeigt, daß der Disulfidstatus verändert ist und diese Proteinformen intramolekulare Disulfidbrücken besitzen. Die nicht glycosylierte Proteinform (Bande 6) verhält sich dagegen nicht sensitiv gegenüber Reduktion, was dafür spricht, daß diese Proteinketten keine intramolekularen Disulfidbrücken aufweisen. Durch die hier beschriebene Charakterisierung der intrazellulären Proteinformen vor und nach Reduktion wurde klar, daß der Thiol/Disulfidbrückenstatus für die Betrachtung der Produktakkumulation für das gewählte rekombinante Protein relevant ist und daher detailliert untersucht werden mußte.

Durch die intensive Analyse mit den Glycosylierungsinhibitoren Tunicamycin, Castanospermin, Desoxymannojirimycin, Desoxynojirimycin und des Transportinhibitors Brefeldin A konnten die Proteinformen der intrazellulären Banden 4 und 5 mit den apparenten Massen 28 kDa und 25 kDa den Glycosylierungsintermediaten des bi- und monoglycosylierten  $\beta$ -TP und der Bande 6 (22 kDa) einer nicht glycosylierten  $\beta$ -TP-Variante zugeordnet werden (Abb. 24). Die biochemische Charakterisierung der intrazellulären Proteinformen zeigt eindeutig, daß das Phänomen der Produktakkumulation des  $\beta$ -TP in infizierten Insektenzellen durch zwei verschiedene Prozesse beschrieben werden kann. Zum einen akkumulieren Intermediate der Proteinglycosylierung, die intramolekular über Disulfide verbrückt sind, zum anderen entstehen nicht glycosylierte Proteinketten ohne intramolekulare Disulfidbrücken.

Wie aus *pulse* und *pulse-chase* Experimenten klar wurde, werden in einem gegebenen Zeitintervall (5 min) größtenteils die glycosylierten Intermediate gebildet. Das läßt die Schlußfolgerung zu, daß für die Untersuchung des Phänomens der intrazellulären Akkumulation des  $\beta$ -TP die Glycosylierungsintermediate relevant sind. Um die Biosynthese und das Sekretionsverhalten der Proteinformen in der ODV-Phase zu verstehen, wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, nach 28 h und 48 h, High Five

und Sf21 Zellen für 5 min mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin gepulst und die intra- und extrazellulären Formen des  $\beta$ -TP nach verschiedenen *chase* Zeiten analysiert. Zum Zeitpunkt der ersten Markierung werden die markierten Biosyntheseintermediate (Bande 4 und 5) noch effizient prozessiert und sekretiert. Zur vollständigen Sekretion dieser Varianten sind dabei in High Five Zellen ca. 4 h erforderlich, während in Sf21 Zellen etwa 8 h benötigt werden (Abb. 30). Durch die Analyse der Biosynthese des Modellproteins nach 48 h mittels eines zweiten *pulse-chase* Experiments konnte nachgewiesen werden, daß der Transport und die reguläre Prozessierung dieser Intermediate im Verlauf der Infektion dramatisch beeinträchtigt wird. So waren selbst nach 48 h *chase* noch 35 % des markierten rekombinanten Proteins stabil mit den Zellen assoziiert (Abb. 31).

Neben den glycosylierten Intermediaten werden in dem gegebenen Zeitintervall zu sehr geringen Anteilen nicht glycosylierte Proteinketten des  $\beta$ -TP synthetisiert (Bande 6). Wie gezeigt werden konnte, lagern sich diese Proteinvarianten in den Zellen ab, und selbst nach 48 h *chase* waren keine signifikanten Mengen abgebaut oder in den Überstand gelangt. Normalerweise werden solch falsch prozessierte Proteinketten von speziellen Chaperonen erkannt, die sie zum Ubiquitinsystem dirigieren, welches die Proteine dann zum 26S-Proteasomen führt, wo sie letztlich abgebaut werden (Wickner et al., 1999, Ellgaard et al., 1999). Die hier gemachte Beobachtung läßt demnach die Vermutung zu, daß der proteasomale Abbau von Proteinen in infizierten Insektenzellen zu diesem Zeitpunkt gestört ist, was auf den Verlust der distinkten Transportkompartimente des Sekretionsweges zurückzuführen ist. Dies führt infolgedessen kausal zu einer Konzentrierung dieser Proteinformen in den Zellen, so daß am Ende der Infektion, diese Formen einen prozentualen Anteil von ca. 15 % am gesamt gebildeten  $\beta$ -TP ausmachen.

Die Akkumulation rekombinanter Proteine in Baculovirus-infizierten Insektenzellen ist wie bereits erwähnt von anderen Arbeitsgruppen festgestellt worden (siehe auch 1.5.). Das Phänomen an sich wurde jedoch in keinem Falle näher untersucht, da es sich bei den jeweils exprimierten Modellproteinen intrazellulär um vermeindlich unlösliche

denaturierte Ablagerungen handelte und eine detaillierte Betrachtung posttranslationaler Modifikationen dadurch nicht möglich war.

Für verschiedene rekombinante Proteine existieren lediglich Untersuchungen bezüglich des Sekretionsverhaltens zu einem Infektionszeitpunkt, die mit *western blotting* Analysen und radioaktiven Markierungen in Kombination mit Glycosylierungsinhibitoren durchgeführt wurden. So berichten beispielsweise Jarvis und Summers (1989), daß der/die geschwindigkeitsbestimmende/n Schritt/e der konstitutiven Sekretion des rekombinanten t-PA aus infizierten Sf9 Zellen nach der Signalpeptidabspaltung und der Initiation der Proteinglycosylierung besteht. Dabei wurden aber nur die löslichen Formen des intrazellulären Proteins in die Untersuchung mit einbezogen. Die Autoren vermuten, daß das Problem der unvollständigen Sekretion und der unlöslichen Proteinformen auf der Bildung falscher inter- und intramolekularen Disulfidbrücken beruht (t-PA besitzt 35 Cysteine), da nach der gängigen Lehrmeinung für einen effizienten Transport und eine geregelte Proteinprozessierung eine korrekte Proteinfaltung eine Vorbedingung ist (Palade (1975), Lodish (1988), Rothmann (1994) und Warren und Mellmann (1999)). Eine inkorrekte Disulfidverbrückung konnte aber in Baculovirus-infizierten Insektenzellen bisher von keiner Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. Die Analyse der Biosynthese des rekombinanten Modellproteins  $\beta$ -TP (nach 28 h) steht im Einklang mit den von Jarvis und Summers erhaltenen Ergebnissen. Im Gegensatz zu der oben diskutierten Arbeit konnte aber auf biochemischer Ebene und durch elektronenmikroskopische Untersuchungen ein direkter Zusammenhang zwischen der Infektion und der Produktakkumulation hergestellt werden.

Allgemein wird in der aktuellen Literatur aufgrund der intrazellulär unlöslichen, denaturierenden Ablagerungen von rekombinanten Proteinen aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen eine falsche Proteinfaltung (wie partiell falsche Disulfidbrücken) aus den oben genannten Gründen postuliert, die versucht wurde und wird, durch Koexpressionen von Chaperonen zu minimieren. Während dabei durch die Koexpression mit Chaperonen wie GRP78 (BiP) (Hsu et al., 1994), PDI (Hsu et al., 1996) und des cytosolischen Chaperons hsp70 (Ailor und Betenbaugh, 1998)

zumindest der Anteil des löslichen Proteins intrazellulär erhöht werden konnte, hatte das aber, wenn überhaupt, nur einen geringen Einfluß auf die Sekretion. Zu gleichen Ergebnissen kamen Lennard und Reiländer (1997), die durch Expression in stabil transfizierten Sf9 und Sfn Zelllinien mit dem Chaperon Peptidyl-cis/trans-Isomerase (PPI) den funktionalen Anteil des membranständigen Membranproteins ninaA (*neither inactivation nor afterpotential*) um den Faktor 5 erhöhen konnten. Insgesamt scheint durch die Expression von Chaperonen der Anteil der unlöslichen denaturierten Ablagerungen vermindert werden zu können. Ein gewisser Teil kann dann möglicherweise weiter prozessiert und sekretiert werden, was zu etwas erhöhten Sekretionsraten führen kann. Wie die hier diskutierten Literaturdaten zeigen, ist es bisher keiner Arbeitsgruppe gelungen, durch diese Eingriffe in den Sekretionsweg von infizierten Insektenzellen die Akkumulation rekombinanter Proteine zu beheben. Diese Strategien sind wie durch die Untersuchungen hinsichtlich der Kompartimentierungen der nichtinfizierten und infizierten Insektenzellen klar wurde, nicht erfolgversprechend, da nicht ein bestimmter, einzelner Prozessierungsschritt für die Akkumulation des rekombinanten  $\beta$ -TP verantwortlich ist.

#### **4.3. Lokalisierung und Isolierung des $\beta$ -TP in zellulären Fraktionen**

Für die Analyse der ko- und posttranslational ausgeführten Modifikationen wie der Signalpeptidabspaltung, des Thiol/Disulfidstatus und der Proteinglycosylierung des rekombinanten  $\beta$ -TP war eine möglichst schnelle und effektive Isolierung des  $\beta$ -TP erforderlich. Die Analyse des Reinigungsprozesses ergab, daß das rekombinante Modellprotein  $\beta$ -TP effektiv aus den Zellen gelöst wurde. Nach dem Ultrazentrifugationsschritt war es quantitativ in der cytosolischen Fraktion (UZÜ) lokalisiert (Ausbeute >90%, Abb. 32). Daraus folgt, daß es sich bei allen  $\beta$ -TP-Formen um lösliche, nicht denaturierte Proteinformen handelt. Die intrazelluläre Akkumulation rekombinanter Proteine ist dagegen wie unter 4.2. diskutiert, als denaturierte unlösliche Ablagerung, vergleichbar der Bildung von *inclusion bodies* in *E. coli*, beschrieben. Es ist dabei in der Literatur nicht dokumentiert, ob es sich wirklich um *inclusion bodies*

handelt. Die hier gezeigte Untersuchung legt nahe, daß unlösliche intrazelluläre Ablagerungen von Proteinen in infizierten Insektenzellen durch die jeweiligen Eigenschaften des Proteins (z. B. oligomere Proteine) verursacht werden und / oder während der Aufarbeitung entstehen. So ist die hier etablierte Reinigungsstrategie mit dem DNA- und RNA-Verdau und der Zellfraktionierung von keiner anderen Arbeitsgruppe angewendet worden. Da bedingt durch die Baculovirusinfektion sehr viel DNA und RNA gebildet wird, ist das aber wahrscheinlich sehr wichtig, um unspezifische Bindungen von DNA und RNA mit dem Modellprotein zu vermeiden, die makromolekulare Aggregate zur Folge haben können. Des weiteren zeigte sich, daß eine anschließende Zellfraktionierung ebenfalls essentiell für die Vermeidung von Aggregaten ist, denn ohne diese beiden Aufarbeitungsschritte wurden auch bei der Isolierung des  $\beta$ -TP unlösliche intrazelluläre Ablagerungen erhalten.

Zusätzlich zu diesem Aufarbeitungsproblem können die intrazellulär unlöslichen Ablagerungen auch durch das Protein *per se* verursacht werden. Grabenhorst (1994) untersuchte das Akkumulationsphänomen durch Expression von IL2 in Insektenzellen. Er löste die intrazelluläre Proteinfraction ebenfalls mit Guanidin-HCl und reinigte sie partiell durch Gelpermeationschromatographie und RP-HPLC, konnte aber unter diesen Bedingungen lediglich 5 % renaturieren und verzichtete daher auf eine detaillierte Analyse des intrazellulär aggregierten Proteins. Da es sich bei dem IL2 um ein sehr hydrophobes Protein handelt, liegt hier die Vermutung nahe, daß die Akkumulation des IL2 in infizierten Insektenzellen auch durch den hydrophoben Charakter des Proteins verursacht worden sein kann. In einer anderen Arbeit berichten Hsu et al. (1994), daß bei der Expression von funktionell aktivem IgG intrazellulär neben unlöslichen Aggregaten eine lösliche IgG-Fraktion der Zusammensetzung  $H_2L_2$  (H, *heavy chain*; L, *light chain*),  $H_2L$  und  $H_2$  vorhanden ist. Durch Koexpression mit dem Chaperon BiP konnte der löslichen Anteil dieser Fraktion erhöht werden. Die Solubilisierbarkeit der intrazellulären rekombinanten Proteine aus Insektenzellen könnte damit auch ein proteinspezifisches Phänomen darstellen. So handelt es sich bei  $\beta$ -TP um ein relativ kleines monomeres Glycoprotein, während IgG aus verschiedenen

Heterooligomeren ( $H_2L_2$ ) aufgebaut ist. Es ist demnach vorstellbar, daß es vor allem bei komplexeren Proteinen wie beispielweise IgG und hydrophoben Proteinen wie dem IL2 und Membranproteinen zu unlöslichen Ablagerungen kommt.

Durch die in der vorgelegten Arbeit etablierte quantitative Reinigung des intrazellulären  $\beta$ -TP sind erstmals repräsentative Aussagen hinsichtlich ausgeführter ko- und posttranslationaler Modifikationen des  $\beta$ -TP in infizierten Insektenzellen möglich, die im folgenden detailliert diskutiert werden sollen.

#### 4.4. Signalpeptidabspaltung

Über die Effizienz der Signalpeptidabspaltung von Prosequenzen rekombinanter Proteine ist sehr wenig bekannt (siehe 1.6.1.). Eine ineffiziente Signalpeptidabspaltung wurde lediglich als eine mögliche Ursache für die Akkumulation rekombinanter Proteine in infizierten Insektenzellen betrachtet, die durch den Austausch von Signalpeptiden sowie die Koexpression mit einer Signalpeptidase umgangen werden kann. So untersuchten Jarvis et al. (1993) den Einfluß von verschiedenen Signalpeptiden und Prosequenzen auf die Expression und Sekretion des humanen t-PA Baculovirus-infizierter Insektenzellen. Die Signalpeptide wurden von Cecropin B, dem 64k-Protein des Baculovirus, dem Prepromellitin und vom Hamster BiP benutzt. Keine der genannten Signalpeptide konnte die Expression und Sekretion des t-PA erhöhen. Auch Tessier et al. (1991) fanden, daß durch die Verwendung des Prepromellitin-Signalpeptids die Sekretion von Propapain oder  $\beta$ -Galactosidase nicht erhöht werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten sie durch Verwendung des *Drosophila* Signalpeptides die Sekretion von Propapain um den Faktor 5 erhöhen. Alternativ versuchten Ailor et al. (1999) durch Koexpression der *Bacillus subtilis* Signalpeptidase mit der leichten Kette eines Antikörpers IgG die Sekretion zu erhöhen. Nach densitometrischer Auswertung der einzelnen Blots konnte nachgewiesen werden, daß die Sekretionsraten nach Koexpression mit der Signalpeptidase um den Faktor 3,5 im Vergleich zur Expression ohne Signalpeptidase erhöht waren. Wie die Autoren berichten, resultierte diese Erhöhung aber aus einem deutlich erhöhten Niveau an

intrazellulären nicht vollständig prozessierten Formen des Modellproteins, da sich die Koexpression mit der Signalpeptidase als sehr toxisch erwies und somit sehr viel intrazelluläres nicht prozessiertes Material in den Überstand gelangte (deutlich niedrigere Vitalität).

Die Untersuchung der N-Termini der einzelnen intrazellulären glycosylierten Proteinbanden des  $\beta$ -TP durch N-terminale Sequenzierung zeigte, daß die Signalpeptidase die naszierenden glycosylierten Proteinketten korrekt erkennt und die Signalpeptide effizient abspaltet (Abb. 33). Potentielle Schnittstellen der Signalpeptidase können auch mit der -1,-3-Regel vorausgesagt werden (von Heijne 1983; siehe 1.6.1.). Nach Anwendung dieser Regel auf die detektierte Schnittstelle der Signalpeptidase des  $\beta$ -TP zeigte sich, daß alle Aminosäuren von +1 bis -6 mit dieser Regel konform gehen, woraus folgt, daß es sich nach dieser Regel um eine korrekte (potentielle) Schnittstelle der Signalpeptidase handelt (Tab. 4). Die nicht glycosylierten Proteinformen des  $\beta$ -TP besitzen dagegen größtenteils einen um ein A verlängerten N-Terminus. Nach den Kriterien der -1,-3-Regel handelt es sich um eine sehr ungewöhnliche Spaltstelle, da einige Aminosäuren lediglich toleriert sind. Gerade aber an den Positionen -1 und -3, die für die Bindung in die Tasche der Signalpeptidase wichtig sind, sind mit Q bzw G eine nicht tolerierte und eine äußerst seltene Aminosäure präsent. Es scheint in diesem Zusammenhang auch denkbar, daß diese Proteinformen durch die in Baculovirus-infizierten Insektenzellen allgemein bekannten proteolytischen Degradationen verursacht worden sein könnten (Grabenhorst, 1994, Schulze, 1996). Wie die detaillierte Analyse der Biosynthese des  $\beta$ -TP zeigte, ist die Syntheserate dieser Proteinketten relativ gering. Da sie aber in den Zellen abgelagert werden, konzentrieren sie sich auf. Durch die detaillierte Analyse der intrazellulären Proteinformen des  $\beta$ -TP zeigt sich damit sehr deutlich, daß die Translokalisierung der Proteinketten in das ER und die Signalpeptidabspaltung effizient ablaufen.

#### 4.5. Thiol/Disulfidbrückenstatus

Um den Einfluß des Thiol/Disulfidbrückenstatus auf die Akkumulation des rekombinanten Proteins  $\beta$ -TP zu klären, sollten mögliche Unterschiede bezüglich dieses Status zwischen den intra- und extrazellulären Proteinformen des  $\beta$ -TP analysiert werden. Das  $\beta$ -TP beinhaltet vier Cysteinreste (Cys43, Cys67, Cys145 und Cys164), kann also prinzipiell zwei Disulfidbrücken ausbilden. Hinsichtlich des Thiolstatus des sekretorischen  $\beta$ -TP ist aber bisher nichts bekannt. Es wird vermutet, daß aufgrund der Sequenz und der dadurch postulierten Lipocalin-Struktur (Nagata et al., 1991) sowie anhand von Untersuchungen durch Austausch von einem oder zwei Cysteinen gegen Threonin oder Serin (Urade et al., 1995) eine Brücke zwischen Cys67 und Cys164 existiert. Zu einer gänzlich anderen Aussage kam hingegen Link (1967) durch Alkylierungsstudien und Aminosäurekomponentenanalysen. Er schloß dadurch auf zwei Disulfidbrücken. Da aber in dieser Studie vor der Alkylierung denaturiert wurde, ist dieses Ergebnis doch sehr zweifelhaft, da so keine nativen Verbrückungen detektiert werden können (siehe 3.4.9.1.). Unter der Annahme, daß das sekretorische  $\beta$ -TP aus High Five Zellen einen nativen Disulfidstatus hat, wurden zunächst die Verknüpfungen des sekretorischen  $\beta$ -TP aus diesen Zellen untersucht. Durch Carboxamidomethylierung/Denaturierung bzw. Denaturierung/Reduktion/Carboxamidomethylierung zeigte sich, daß eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cys67 und Cys164 besteht, während Cys43 und Cys145 als freie Thiole vorliegen (Abb. 47, 48). Zusätzlich wurde bei dem Peptid mit Cys43 partiell eine ungewöhnliche Modifikation detektiert (Masse 1398,6), deren Identität jedoch nicht geklärt werden konnte. Da es bekannt ist, daß an dem  $\beta$ -TP ein Chromophor gebunden ist (H.S. Conradt, pers. Mitteilung), handelt es sich möglicherweise um ein Peptid, an dem ein Chromophor gebunden ist. Es ergaben sich keine Hinweise auf gemischte Disulfide (Prot-S-S-Glutathion). Um die Ergebnisse abzusichern, wurde das  $\beta$ -TP aus rekombinanten BHK-21 Zellen ebenfalls untersucht, da das konstitutiv sekretorische  $\beta$ -TP aus diesen Zellen homogen ist und kaum intrazelluläre Formen, wie bei Insektenzellen möglich, in den Überstand gelangen können. Die Analyse des



Disulfidstatus erbrachte den gleichen Befund (Abb. 49). Damit bestätigen die Ergebnisse die Arbeiten von Nagata et al. (1991) und Urade et al. (1995).

Wie die Analyse der intra- und extrazellulären Proben des  $\beta$ -TP aus High Five und Sf21 Zellen zeigte, konnte in allen Fällen die Disulfidbrücke Cys67-Cys164 detektiert werden (Abb. 50, 51). Auch die freien Cys145 und Cys43 sowie die ungewöhnliche Modifikation des Cys43 sind identifizierbar. Daneben sind aber auch signifikante Mengen an anderen Disulfidbrücken nachweisbar, die durch Artefakte bedingt durch die angewandte Chemie entstanden sind (3.4.9.1. Strategie der Disulfidbrückenanalytik).

Die Massenspektren der intra- und extrazellulären Proben des  $\beta$ -TP aus High Five und Sf21 Zellen weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß der Thiol/Disulfidbrückenstatus nicht kausal für die Akkumulation des  $\beta$ -TP verantwortlich ist. Es ergeben sich damit keine Hinweise auf die in der Literatur allgemein postulierte, falsche Proteinfaltung, was wiederum ein Anhaltspunkt ist, daß das Phänomen der Akkumulation rekombinanter Proteine durch die Infektion (mit der Etablierung der ODV) und die dadurch bedingte Auflösung bzw. das Verschmelzen der Kompartimente des Sekretionsweges verursacht wird.

#### **4.6. Proteinglycosylierung**

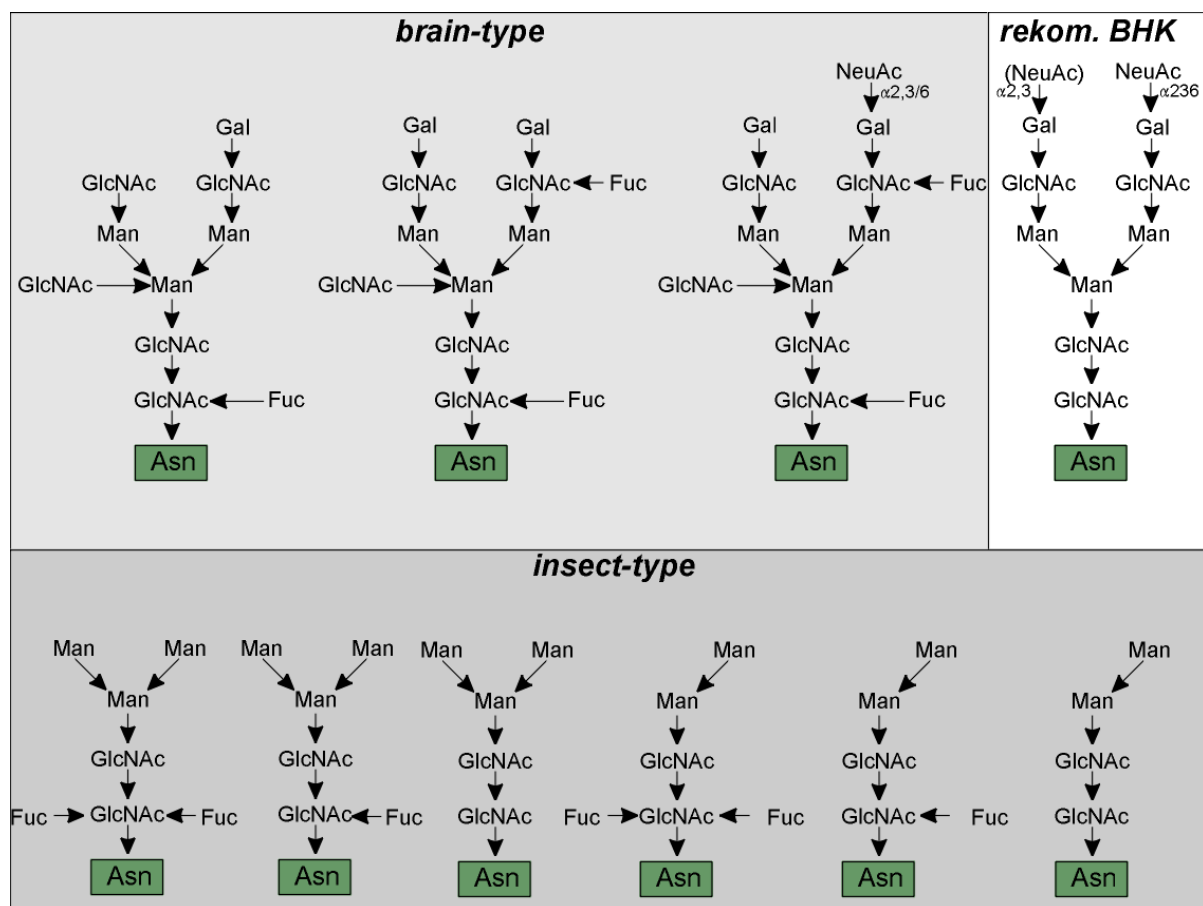
##### **4.6.1. Glycosylierungskapazität von Insektenzellen**

Über den gesamten Infektionsverlauf zeigt sich, daß die einzelnen Molekulargewichtsformen des  $\beta$ -TP gleichmäßig sekretiert werden, so daß davon ausgegangen werden kann, daß eine dramatische Änderung des Glycosylierungsstatus über die Zeit nicht stattfindet. Aus diesem Grund erfolgte die Analyse der N-Glycane des extrazellulären  $\beta$ -TP nur zu einem Zeitpunkt, nach 72 h. Das sekretorische  $\beta$ -TP aus Insektenzellen beinhaltet hauptsächlich paucimannosidische Strukturen mit zwei oder drei Mannosen ( $\text{Man}_{2-3}\text{GlcNAc}_2$ ). Diese können Zellinien-spezifisch mit einer (Sf21 Zellen) oder zwei Fucosen (High Five Zellen) proximal fucosyliert sein. Das Verhältnis von fucosylierten zu nichtfucosylierten Strukturen

beträgt etwa 2:1 (Abb. 54, *insect-type*). Der Anteil dieser Strukturen an den N-Glycanstrukturen des extrazellulären  $\beta$ -TP beträgt in Sf21 Zellen 77 % und in High Five Zellen 69 %. Daneben waren noch signifikante Mengen an *high-mannose-type* Strukturen ( $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ ) detektierbar, die durch die zunehmende Lyse der Zellen im Verlauf der Baculovirusinfektion in den Überstand gelangt sind.

Auch Grabenhorst (1994) ermittelte bei dem selben Modellprotein extrazellulär diese N-Glycane mit dem gleichen Fucosylierungsgrad. In der vorliegenden Arbeit konnten zudem auch geringe Mengen an N-Glycanstrukturen mit einem terminalen GlcNAc detektiert werden. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Strukturen des Typs  $\text{GlcNAcMan}_{3-4}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$ . Strukturen mit terminaler Galactose und sialylierte Strukturen konnten mit den hier verwendeten Methoden wie MALDI/TOF-MS, ESI-MS und ESI-MS-MS nicht detektiert werden. Die Menge der Proteinformen, deren N-Glycane mit einem terminalen GlcNAc modifiziert waren, wurde nicht quantifiziert. Aus den Massenspektren wird abgeleitet, daß der Anteil dieser Strukturen schätzungsweise zwischen 5 - 10 % der Gesamtstrukturen liegt. Die Analyse der N-Glycane des  $\beta$ -TP aus Baculovirus-infizierten High Five und Sf21 Zellen zeigt die Wirtszell-spezifische Glycosylierungskapazität von Lepidopterenzellen ganz deutlich. Die Wirtszell-spezifische Glycosylierung bzw. Gewebe-spezifische Glycosylierung drückt sich darin aus, daß die äußeren Antennen von N-Glycanen mit Monosacchariden besetzt sind, die durch die Existenz von entsprechenden Glycosyltransferasen, Nucleotid-Zuckern und Transportern determiniert sind. So werden alle Proteinformen des  $\beta$ -TP aus der Cerebrospinalflüssigkeit und aus rekombinanten BHK-21 Zellen im Gegensatz zum  $\beta$ -TP aus Insektenzellen komplett zu *complex-type* Strukturen prozessiert. Wie Hoffmann et al. (1992, 1993) zeigen konnten, weisen die beiden potentiellen Glycosylierungsstellen des  $\beta$ -TP aus der cerebrospinalen Flüssigkeit biantennäre, am proximalen GlcNAc  $\alpha$ 1,6-fucosylierte, *complex-type* Grundstrukturen auf. Des weiteren sind die N-Glycane des  $\beta$ -TP aus dieser Flüssigkeit durch ein *bisecting* GlcNAc und durch periphere Fucose in Form von Lewis<sup>x</sup> und NeuAc in  $\alpha$ 2,3 oder  $\alpha$ 2,6-Bindung charakterisiert (Abb. 54, *brain-type*).

Alternativ existieren aber auch Formen mit Asialo- bzw. Agalactostrukturen. Das  $\beta$ -TP aus der cerebrospinalen Flüssigkeit ist damit Gewebe-spezifisch *brain-type* glycosyliert. Das aus stabil transfizierten BHK-Zellen konstitutiv sekretierte  $\beta$ -TP weist demgegenüber eine etwas andere Wirtszell-spezifische Glycosylierung auf (*serum-type*, Abb. 54). Die Glycane besitzen hochsialylierte Antennen mit biantennären *complex-type* Strukturen (Grabenhorst, 1995). Demzufolge zeigt die Analyse der N-Glycane des Modellproteins  $\beta$ -TP aus Insektenzellen mit den paucimannosidischen Strukturen  $\text{Man}_{2-3}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$ , daß Lepidopteren generell nicht in der Lage sind, *complex-type* Strukturen auszubilden.



**Abb.54** Gewebe-spezifische Glycosylierung des Modellproteins  $\beta$ -TP. Schematische Darstellung der Haupt-N-Glycanstrukturen des  $\beta$ -TP aus der Cerebrospinalflüssigkeit (*brain-type*), aus rekombinanten BHK-Zellen (*rekom. BHK*) und aus Baculovirus-infizierten High Five und Sf21 Zellen (*insect-type*).

Die Analyse der N-Glycane des  $\beta$ -TP aus High Five und Sf21 Zellen befindet sich in sehr guter Übereinstimmung mit N-Glycananalysen anderer Modellproteine aus Lepidopteren, die mit den komplementären Methoden der HPAEC.PAD und/oder Massenspektrometrie ermittelt wurden (siehe 1.6.3.). Daraus folgt, daß das auch ein weiteres Beispiel dafür ist, daß Insektenzellen die Fähigkeit zur Synthese von sialylierten Strukturen fehlt. Die hier vorgelegten Daten werden durch die Arbeit von Hooker et al. (1999) untermauert, die in Insektenzellen weder eine für die Anheftung von Sialinsäuren essentielle Sialyltransferaseaktivität noch den Nucleotidzucker CMP-NeuAc nachweisen konnten.

#### 4.6.2. Analyse der intrazellulären N-Glycane des $\beta$ -TP aus Insektenzellen

Wie bei der Charakterisierung der intrazellulären Proteinformen durch Glycosylierungsinhibitoren gezeigt werden konnte, handelt es sich bei den Proteinformen der Banden 4 (28 kDa) und 5 (25 kDa) auf dem Western Blot um glycosylierte Biosyntheseintermediate des  $\beta$ -TP. Die Proteinformen der Bande 6 (22 kDa) konnten eindeutig als nicht glycosylierte Proteinketten identifiziert werden.

Zunächst erfolgte die Untersuchung der intrazellulären N-Glycane des  $\beta$ -TP analog zur Analyse der Oligosaccharide des sekretorischen  $\beta$ -TP nach 72 h p.i. Wie die Analyse ergab, handelt es sich bei den Banden 4 und 5 um Proteinformen mit *high-mannose-type* N-Glycanen, wobei die Majorität die Strukturen  $\text{Man}_{7-8}\text{GlcNAc}_2$  besitzen (Abb. 38, Tab. 10). Wie erwartet, besitzen diese N-Glycane keine proximalen Fucosen, weder in  $\alpha 1,6$ - noch in  $\alpha 1,3$ -Stellung. Daneben sind aber auch signifikante Mengen der Glycane  $\text{Man}_{2-3}\text{F}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  detektierbar. Dieser Anteil ist in beiden Zellen vergleichbar und beträgt in High Five Zellen 16 % und in Sf21 Zellen 25,5 %. Wie die Charakterisierung der Produktbildung zeigte und wie unter 4.2 und 4.3 diskutiert, besteht ein sehr kleines Zeitfenster zu Beginn der Infektion zwischen 0-20 h, in dem die intrazelluläre Kompartimentierung noch nicht gestört ist. Durch *western blotting* konnte nachgewiesen werden, daß es sich um intrazelluläre Proteinformen handelt, die identische apparente Massen wie die aus dem Medium stammenden  $\beta$ -TP

Proteinformen aufweisen. Um dies zu bestätigen wurde eine intrazelluläre Probe des  $\beta$ -TP aus High Five Zellen aus diesem Zeitintervall gereinigt und analysiert. Es wurden dabei Strukturen gefunden, die mit den zuvor in der extrazellulären Fraktion des  $\beta$ -TP nach 72 h detektierten identisch waren (Abb. 45, Tab. 6).

Hsu et al. (1997) berichten, daß nach Koexpression mit BiP und anschließender partieller Reinigung des intrazellulären Modellproteins IgG aus infizierten High Five Zellen über 50 % der N-Glycane des IgG oligomannosidische Strukturen aufwiesen. Mit der in dieser Arbeit angewandten Methode (2D-HPLC) besitzt die Analyse und Quantifizierung der N-Glycane rekombinanter Proteine aus Insektenzellen freilich nur begrenzte Aussagekraft, da mit dieser Methode generell die Strukturen  $\text{Man}_2\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  und alle proximal  $\alpha 1,3$ -fucosylierten Oligosaccharide nicht erfaßt werden können. (siehe 1.6.3.). Aufgrund der dort ermittelten oligomannosidischen Strukturen schließen die Autoren auf eine Retention zwischen ER und Golgi-Apparat bzw. vermuten eine verlangsamte Proteinprozessierung. Hooker et al. (1999) analysierten das intrazelluläre N-Glycan Muster von IFN- $\gamma$  durch MALDI/TOF-MS. Mit dieser Methode können die relativen Verhältnisse der vorhandenen N-Glycane nur geschätzt werden. Eine Quantifizierung ist nur durch eine dazu komplementäre Methode wie die HPAEC-PAD möglich. Im Gegensatz zu der Arbeit von Hsu et al. (1997) sind die Aussagen trotzdem repräsentativer, da es durch die Methode generell möglich ist, alle N-Glycanstrukturen zu ermitteln. Aufgrund der relativen Mengen von paucimannosidischen und oligomannosidischen Strukturen des verwendeten Modellproteins postulieren sie die Produktakkumulation als Transportprobleme, die zwischen dem ER und cis-Golgi und dem trans-Golgi und Transport in den Überstand bestehen. Die Grundkonzeption beider Arbeiten geht insgesamt aber von einer intakten Kompartimentierung des Sekretionsweges aus. Wie in der vorliegenden Arbeit eindeutig bewiesen werden konnte, ist diese Annahme jedoch falsch. Durch die Analyse der N-Glycane des  $\beta$ -TP mit den komplementären Methoden der Massenspektrometrie und der HPEAC-PAD in Verbindung mit den elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde vielmehr klar, daß zu Beginn der

Expression des rekombinanten Proteins, in der Übergangsphase, die intrazelluläre Kompartimentierung des Sekretionsweges nicht gestört ist. Das rekombinante Protein ist intrazellulär im ER und Golgi nachweisbar, wobei intrazellulär hauptsächlich N-Glycane mit der Struktur  $\text{Man}_{2-3}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  vorhanden sind. Das heißt, der Transport und die regulierte Prozessierung ist in dieser Phase nicht gestört. Mit der Etablierung der ODV-Phase und dem damit verbundenen Verlust der Transportkompartimente des Sekretionsweges wird der Transport und die Proteinprozessierung zunehmend beeinträchtigt, wodurch es zur Akkumulation des  $\beta$ -TP mit oligomannosidischen Strukturen (hauptsächlich  $\text{Man}_{7-8}\text{GlcNAc}_2$ ) kommt. Es ist demnach klar, daß es sich nicht um Transportprobleme zwischen distinkten Kompartimenten wie ER und Golgi-Apparat handelt, sondern vielmehr um generelle Probleme des Transportes und der geregelten Proteinprozessierung zwischen einzelnen Prozessierungsschritten. So scheint ein für die sequentielle Prozessierung notwendiger regulärer Transport innerhalb dieser großen vesikulären Strukturen nicht mehr gewährleistet. Des weiteren scheint es denkbar, daß es durch die Bildung dieser vesikulären Strukturen zu einem „Ausverdünnen“ an prozessierenden Enzymen wie den Mannosidasen kommt, was sich dann in einer stark verlangsamten Prozessierung bemerkbar macht, so daß signifikante Produktmengen mit den N-Glycanen  $\text{Man}_{7-8}\text{GlcNAc}_2$  über einen längeren Zeitraum in diesen Strukturen verbleiben. Wie die Lokalisierung des intrazellulären Modellproteins in großen vesikulären Strukturen weiter nahelegt, sollten im Verlauf der Infektion eigentlich große Anteile der intrazellulär detektierten Proteinformen in den extrazellulären Raum der Zellen gelangen. Aus den Untersuchungen geht aber klar hervor, daß anscheinend nur  $\beta$ -TP-Proteinformen mit N-Glycanketten von  $\text{Man}_{2-3}\text{GlcNAc}_2$  im Überstand sekretiert werden, während oligomannosidische Proteinformen und fehlerhaft prozessierte Proteinformen zurückgehalten werden oder nur marginal vorhanden sind. In diesem Zusammenhang ist es zwar vorstellbar, daß die Proteinformen mit oligomannosidischen Strukturen zusammen mit den Proteinformen mit paucimannosidischen N-Glycanen in das Medium gelangen, wo sie durch im Medium vorhandene Hydrolasen demannosyliert

werden. Nicht vorstellbar ist hingegen, daß diese dann demannosylierten Strukturen durch im Medium vorhandene Fucosyltransferasen proximal fucosyliert werden, da dieses eine hohe stationäre Konzentration von Donorsubstraten (GDP-Fuc), Glycosyltransferase (Fucosyltransferase) und Akzeptor ( $\beta$ -TP) voraussetzt (Grabenhorst et al., 1999). Somit scheinen nur die Proteinformen mit paucimannosidischen Strukturen von den Insektenzellen sekretiert zu werden. Die Selektivität, mit denen ausschließlich diese Strukturen in das Medium gelangen, kann durch diese Arbeit nicht geklärt werden.

#### **4.6.3. Prozessierung der Glycane von $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ zu $\text{Man}_{2-3}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$ in infizierten Insektenzellen**

Die Prozessierung der N-Glycane zu den Strukturen  $\text{Man}_{2-3}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  verläuft den Säugerzellen entsprechend über das  $\text{Man}_5$ -Intermediat. Die weitere Prozessierung erfordert GlcNAc-Transferase I-Aktivität, die in Lepidopteren nachgewiesen wurde (Schachter, 1991) und die wie von Altmann et al. (1993) und Velardo et al. (1993) veröffentlicht, in signifikanten Mengen vorhanden ist. Anschließend demannosyliert die  $\alpha$ -Mannosidase II das Glycan zur Struktur  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ . Unklar ist bei dieser Prozessierung, welches Substrat als Akzeptor für die Fucosyltransferasen dient oder ob es mehrere Akzeptoren gibt. Sicher scheint dabei zu sein, daß die  $\alpha 1,6$ - bzw.  $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferasen nur bei Präsenz des nicht reduzierten terminalen GlcNAcs fucosylieren können (Staudacher und März, 1998, Schachter, 1991, Altmann und März, 1995, Ren et al., 1997). So wurde von Altmann (1995) diskutiert, daß schon  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  ein Akzeptor für die Fucosyltransferasen sein könnte. Der in dieser Arbeit vorgeschlagene Weg der Prozessierung konnte bisher von keiner Arbeitsgruppe durch Einzelstrukturen belegt werden, da gerade die prozessierenden Schritte um  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  zu den reifen Formen  $\text{Man}_{2-3}\text{F}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  sehr schnell ablaufen. In den letzten Jahren hat sich dann auch immer mehr die Ansicht durchgesetzt, daß  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$  zumindest der Hauptakzeptor für die Fucosyltransferasen ist (Altmann, 1999). Lediglich in einem Fall sind durch Analyse der

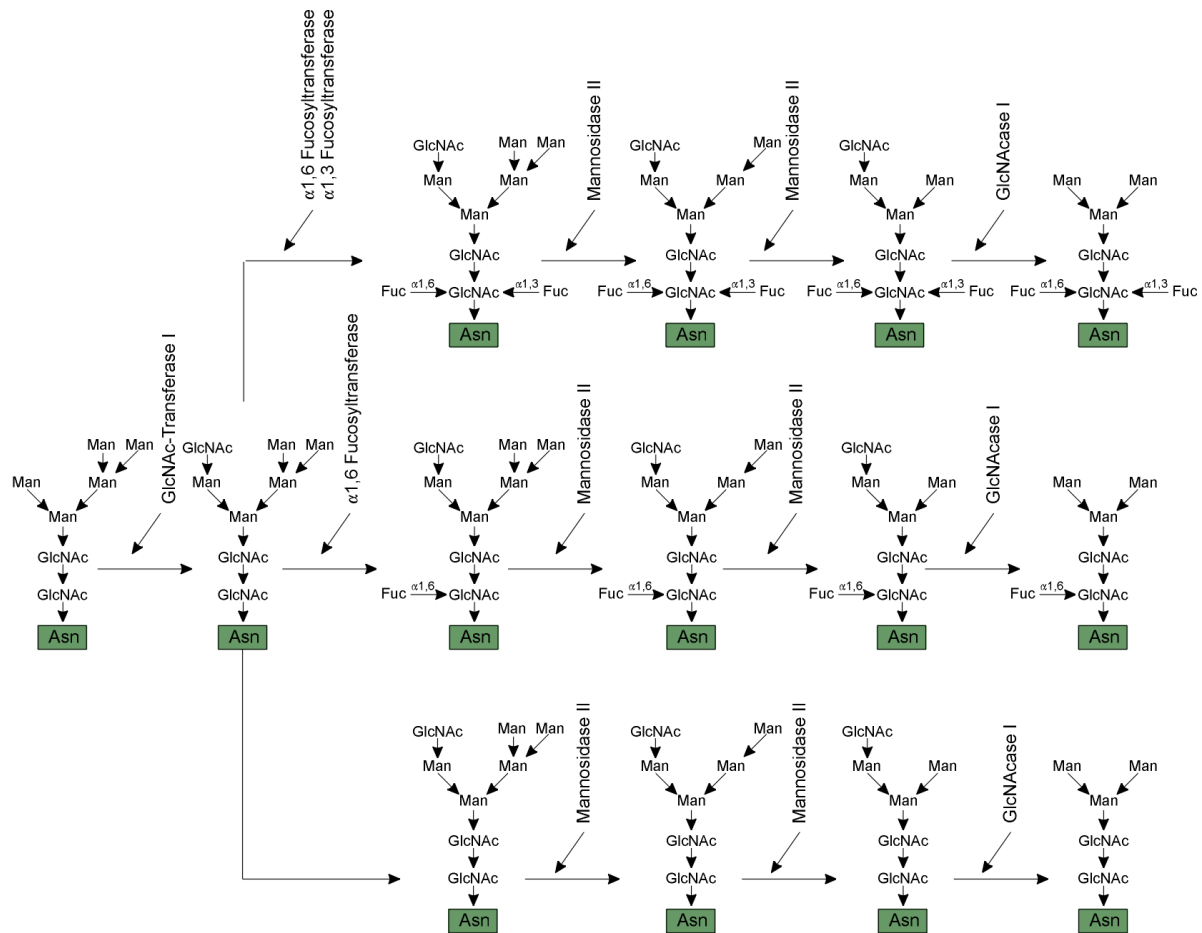
N-Glycane aus Sf9-Zellen bei Verwendung von Proteinbiosynthese-Inhibitoren zwei Intermediate dieser Kaskade, nämlich  $\text{GlcNAcMan}_5\text{FucGlcNAc}_2$  und  $\text{GlcNAcMan}_3\text{FucGlcNAc}_2$ , indirekt durch HPLC-Analyse von radioaktiv markierten N-Glycanen nachgewiesen worden (Marchal et al., 1999).

Durch MALDI/TOF-MS- und ESI-MS-MS-Analyse der N-Glycane der intra- und extrazellulären Formen des  $\beta$ -TP konnten eindeutig die Glycosylierungsintermediate  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{GlcNAcMan}_4\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  nachgewiesen werden. Diese Intermediate geben damit einen Hinweis, daß die Fucosylierung schon auf der Stufe von  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  stattfindet.

Ausgehend von den hier ermittelten Strukturen erfolgte für die weitere intensive Untersuchung der Prozessierungsschritte von  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  zu  $\text{Man}_{2-3}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  die Analyse der N-Glycane des  $\beta$ -TP nach Inkubation mit dem Mannosidase II-Inhibitor Swainsonin analog der Arbeit von Marchal et al. (1999). Durch ESI-MS-MS konnten zweifelsfrei die N-Glycane  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAcMan}_5\text{FucGlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_5\text{FucGlcNAc}_2$  und  $\text{GlcNAcMan}_4\text{FucGlcNAc}_2$  nachgewiesen werden. Die MALDI-MS Analyse der Glycopeptide und der permethylierten N-Glycane zeigt zusätzlich die Existenz der Oligosaccharide  $\text{GlcNAcMan}_5\text{Fuc}_2\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_5\text{Fuc}_2\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_4\text{FucGlcNAc}_2$  und  $\text{Man}_4\text{Fuc}_2\text{GlcNAc}_2$ . Wie daraus ersichtlich wird, ist nicht  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$  der Akzeptor für die Fucosyltransferasen, sondern  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ .

Desweiteren kann erstmals der von Altmann (1995) vorgeschlagene Weg der Prozessierung komplett durch die Einzelstrukturen  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAcMan}_5\text{Fuc}_2\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAcMan}_5\text{FucGlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAcMan}_4\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAcMan}_4\text{Fuc}_2\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{GlcNAcMan}_4\text{FucGlcNAc}_2$  zweifelsfrei belegt werden (Abb.55). Alternativ kann aber das terminale GlcNAc auch schon vor dem Wirken der Mannosidase II entfernt werden, wie durch  $\text{Man}_5\text{FucGlcNAc}_2$  und  $\text{Man}_5\text{Fuc}_2\text{GlcNAc}_2$  bestätigt wird. Die Mannosidase II ist dann aber nicht mehr in der Lage, die beiden Mannosen auf dem  $\alpha$ 1,6-Arm zu entfernen. Die Existenz der Oligosaccharide  $\text{Man}_{4-5}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  legen zum einen ungewöhnliche Mannosidase-Aktivitäten nahe.





**Abb.55.** Prozessierung der N-Glycane in Insektenzellen von  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  zu  $\text{Man}_3\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$ . Diese Glycane können noch weiter demannosyliert werden. Asn, Asparagin; GlcNAc, N-Acetylglucosamin; Man, Mannose; Fuc, Fucose

Solche ungewöhnlichen Mannosidasen wurden von Hughes (1991) in Säugertierzellen beschrieben, entstammen aber, wie der Autor berichtet, *minor pathways*. Es handelt sich dabei um eine endo-Mannosidase, die bevorzugt Proteine mit den Oligosaccharidstrukturen  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_{5-8}\text{GlcNAc}_2$  in  $\text{Man}_{3-5}\text{GlcNAc}_2$  umwandelt und eine  $\alpha$ -Mannosidase (Mannosidase III), durch die Proteinformen mit den Strukturen  $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$  schrittweise zu der Struktur  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  prozessiert werden. In Insektenzellen sind diese Mannosidasen allerdings bisher nicht nachgewiesen worden. Deshalb erscheint es viel wahrscheinlicher, daß es aufgrund der Akkumulation des  $\beta$ -TP bzw. durch eine verlängerte Retention des Modellproteins in den Zellen zu unspezifischen Hydrolysen kommt. Diese Hypothese wird untermauert durch die auch

bei der Analyse der N-Glycane des intrazellulären  $\beta$ -TP detektierten Strukturen  $\text{ManF}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  und Proteinformen, die nur mit einem einzelnen GlcNAc modifiziert sind. Somit scheint es sich um ein *proteinageing* durch Hydrolyse der N-Glycanketten zu handeln.

#### 4.6.4. Beteiligung der Proteinqualitätskontrolle an der Akkumulation des $\beta$ -TP

Die verlängerte Retention von falsch gefalteten oder inkomplett gefalteten Proteinen führt normalerweise zu deren Degradation (Ellgaard et al., 1999, Wickner et al., 1999). Persistent falsch gefaltete Glycoproteinketten werden für die Degradation auf der Stufe  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  durch die Mannosidase I markiert. Nach der Reglucosylierung durch die Glucosyltransferase bindet das Protein an Calnexin/Calreticulin. Da das  $\text{GlcMan}_8\text{GlcNAc}_2$  im Gegensatz zu  $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$  ein schlechtes Substrat für die Glucosidase II ist, bleibt das Glycoprotein mit Calnexin/Calreticulin assoziiert, wird in das Cytosol überführt, deglycosyliert und durch das 26S-Proteasomen abgebaut. Der Reglucosylierungs-Zyklus und der Abbau ist auch in Insektenzellen beschrieben (McCaroll und King, 1997, Parker et al., 1995). Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob in den intrazellulären Glycanen des  $\beta$ -TP signifikante Mengen der  $\text{Hex}_9\text{GlcNAc}_2$ -Glycane die Struktur  $\text{GlcMan}_8\text{GlcNAc}_2$  aufweisen, was eine Verknüpfung zur primären Proteinqualitätskontrolle anzeigen würde. Die ESI-MS-MS-Analyse des  $\text{Hex}_9\text{GlcNAc}_2$ -Glycans des  $\beta$ -TP aus Insektenzellen nach 72 h p.i. zeigte ein sehr ähnliches Fragmentierungsmuster im Vergleich zu einem  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Standard. Die absolute Majorität der N-Glycane entspricht damit sicher der Struktur  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ . In Anbetracht der Tatsache, daß die  $\text{Hex}_9\text{GlcNAc}_2$ -Formen intrazellulär 5 % im Falle von High Five Zellen bzw. 1,5 % in Sf21 Zellen ausmachen (HPAEC-PAD-Analyse) und von diesen der größte Teil die Struktur  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  aufweist, ergibt sich kein Hinweis darauf, daß der Calnexin/Calreticulin-Zyklus kausal für die verlängerte Retention der Vorläufer verantwortlich ist.

#### 4.6.5. Zelleigene Gesamtoligosaccharidstrukturen infizierter und nicht infizierter Insektenzellen

Generell ist es vorstellbar, daß die zelleigenen Proteine anders glycosyliert werden als Baculovirus-exprimierte Proteine. In den Analysen der N-Glycane des intrazellulären Modellproteins zeigte sich wie bereits diskutiert, daß durch die Baculovirusinfektion Proteinformen mit oligomannosidischen Strukturen akkumulieren. In diesem Zusammenhang war es interessant zu untersuchen, ob dies auch auf der Ebene der Gesamt-N-Glycane detektiert werden kann, also ob es sich um ein generelles Phänomen handelt. Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen, wurden die Gesamt-N-Glycane aus Sf21-Zellen vor und nach Baculovirusinfektion (72 hpi) detailliert durch MALDI-MS und HPAEC-PAD untersucht. Wie die Analyse zeigte, sind für die Betrachtung des Gesamt-N-Glycanmusters in infizierten als auch nichtinfizierten Insektenzellen die Membranfraktion (relative Anteile an Gesamt-N-Glycane betragen in infizierten Zellen 18 % und 43 % in nicht infizierten Zellen) und der Überstand (relative Anteile an den Gesamt-N-Glycanstrukturen betragen 76 % in infizierten Zellen und 42 % in nicht infizierten Zellen) relevant. Der hohe Anteil an N-Glycanstrukturen im Überstand ist dabei sicherlich auf die zu diesem Infektionszeitpunkt hohen Konzentrationen des rekombinanten  $\beta$ -TP und verschiedener viraler Glycoproteine wie dem gp64 sowie auf proteolytische Abbaureaktionen von Membranproteinen zurückzuführen.

Die analysierten Haupt-N-Glycane von infizierten und nicht infizierten Sf21 Zellen sind durch die beiden Strukturtypen  $\text{Man}_3\text{Fuc}_{0-1}\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$  charakterisiert, wobei extrazellulär paucimannosidische Strukturen (73%) und intrazellulär oligomannosidische Strukturen (69 %) die Hauptstrukturen repräsentieren. Wie aus der Analyse weiter klar hervorgeht, erhöht sich intrazellulär nach der Infektion der Anteil der oligomannosidischen Glycane (85 %). Dies steht im Einklang mit den Ergebnisse der Analyse der Produktakkumulation des rekombinanten Modellproteins in infizierten Insektenzellen. Dort konnte eindeutig belegt werden, daß im Verlauf der Infektion der Transport und die reguläre Prozessierung der Proteine zunehmend gestört wird, was

sich in der Akkumulation von oligomannosidischen Strukturen bemerkbar macht. In der Analyse der Gesamt-N-Glycane aus dem Überstand der infizierten Probe konnte durch massenspektrometrische Analyse (MALDI/TOF-MS) eindeutig die sialylierten Strukturen NeuAc<sub>1-3</sub>(GalGlcNAc)<sub>3</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> identifiziert werden. Diese N-Glycane konnten intrazellulär nicht detektiert und ebenfalls auch in den nicht infizierten Proben nicht nachgewiesen werden. Bei diesen Strukturen handelt es sich wahrscheinlich um typische Glycane von FCS-Proteinen (wahrscheinlich Fetuin, Nimtz, pers. Mitteilung), die bei der Infektion durch Inokulierung des Virusstocks (Endkonzentration des FCS gleich 0,1 %) in den Überstand der infizierten Probe gelangt sind. Insgesamt konnte damit erstmals zweifelsfrei gezeigt werden, daß von Insektenzellen zelleigene Proteine nicht anders glycosyliert werden als Proteine aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen.

#### 4.7. Zusammenfassung und Ausblick

Wie in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, ist die Akkumulation rekombinanter Proteine in Baculovirus-infizierten Insektenzellen an die Replikation des Baculovirus gebunden. Die beiden für die Produktexpression rekombinanter Proteine relevanten Phasen, die Übergangsphase und die ODV-Phase, sind durch folgende Merkmale gekennzeichnet:

##### *Übergangsphase*

- S Die intrazelluläre Kompartimentierung ist noch intakt. Das rekombinante Modellprotein  $\beta$ -TP ist in den Transportkompartimenten des Sekretionsweges, im ER und Golgi-Apparat lokalisiert.
- S Der geregelte Transport und die reguläre Glycoprotein-Prozessierung des  $\beta$ -TP verläuft **zwischen und innerhalb** der Kompartimente zu diesem Zeitpunkt noch sehr effizient.

*ODV-Phase*

- S Durch die komplette Umordnung des Cytoskeletts der Zellen verschmelzen die distinkten Kompartimente des Sekretionsweges miteinander (ER und Golgi-Apparat). Es entstehen zwei verschiedenartige vesikuläre Strukturen, eine elektronendichte (DV) und eine elektronendurchlässige (LV). Diese fusionieren im Verlauf der Infektion zu Megavesikeln.
- S Durch den Verlust der distinkten Zellkompartimente kommt es zur Akkumulation von Glycosylierungsintermediaten, die größtenteils die Strukturen  $\text{Man}_{7-8}\text{GlcNAc}_2$  besitzen. Die Signalpeptidabspaltung und die Bildung der Disulfidbrücken dieser Proteinformen des  $\beta$ -TP verlaufen sehr effizient.
- S Die primäre Qualitätskontrolle (Calnexin/Calreticulin-Zyklus) der Zellen ist nicht für die Akkumulation des  $\beta$ -TP verantwortlich.
- S Die Akkumulation der Glycosylierungsintermediate wird, wie sich zeigte, durch generelle Probleme des geregelten Transportes und der regulären sequentiellen Proteinprozessierung **innerhalb** der großen vesikulären Strukturen verursacht. Im Verlauf der Infektion verstärken sich diese Probleme drastisch.

Wie die Lokalisierung des intrazellulären Modellproteins in großen vesikulären Strukturen weiter nahelegt, sollten im Verlauf der Infektion eigentlich große Anteile der intrazellulär detektierten Proteinformen in den extrazellulären Raum der Zellen gelangen. Das ist jedoch nicht der Fall. Wie aus den Untersuchungen klar hervorgeht, werden nur  $\beta$ -TP-Proteinformen mit N-Glycanketten des Typs  $\text{Man}_{2-3}\text{Fuc}_{0-2}\text{GlcNAc}_2$  im Überstand detektiert. Die Selektivität, mit denen ausschließlich diese Strukturen in das Medium gelangen, kann durch diese Arbeit nicht geklärt werden.

Generell erscheint ein *metabolic engineering* durch Koexpression mit Chaperonen etc., wenig aussichtsreich. Sehr wahrscheinlich können nur gezielte *knock-outs* von Genen des Baculovirus, die funktional für die Umordnung des Cytoskeletts verantwortlich sind, das Akkumulationsproblem beheben. Die einzelnen Komponenten, die für diese Vorgänge verantwortlich sind, sind bisher jedoch nicht identifiziert.

Ein weiterer Schwerpunkt auf dem Gebiet der Baculovirus-Forschung stellt die gezielte Verbesserung des Glycosylierungspotentials durch *genetic engineering* Ansätze zur Produktion humanähnlicher Glycoproteine dar. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Analyse des rekombinanten Modellproteins  $\beta$ -TP und durch Analyse der Gesamt-N-Glycane aus nichtinfizierten und infizierten Sf21 Zellen bestätigt werden, daß Insektenzellen prinzipiell nur in der Lage sind, paucimannosidische Strukturen des Typs  $\text{Man}_{2-3}\text{GlcNAc}_2$  zu synthetisieren, die mit keiner, einer oder zwei proximalen Fucosen ausgestattet sein können. Des weiteren konnte nachgewiesen werden, daß Insektenzellen zelleigene Proteine nicht anders glycosylieren als Baculovirus-exprimierte Proteine. In keinem Falle wurden sialylierte und biantennäre mit terminalen GlcNAcs modifizierte Glycane detektiert. Lactosaminketten konnten mit den verwendeten sehr sensitiven Methoden des Massenspektrometrie ebenfalls nicht detektiert werden. Hollister et al. (1998) berichten von der Synthese von Lactosamin-Ketten durch *genetic engineering* durch stabile Transfektion einer  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase. Durch *lectin blotting* konnten sie zeigen, daß ihre Modellproteine t-PA und gp64 mit Lactosaminketten modifiziert waren. Eine genaue Analyse durch MALDI-MS und HPAEC-PAD zeigte hingegen die limitierte Glycosylierungskapazität auf. 33 % der Gesamtstrukturen waren galactosyliert, aber ausschließlich auf dem 1,3-Arm (H.S. Conradt pers. Mitteilung, GBF, Braunschweig). Zur Ausbildung von humanähnlichen *complex-type* Strukturen benötigen die Zellen nach heutigem Wissensstand minimal noch folgende Enzymsausstattung: GlcNAc-II-VI-Transferase-Aktivität, Sialyltransferase-Aktivität, Fähigkeit zur Anheftung von peripheren Fucosen zur Bildung von Lewis<sup>x</sup> bzw. SialylLewis<sup>x</sup>-Motiven, Fähigkeit zur Bildung von CMP-NeuAc und CMP-NeuAc-Transporter-Aktivität. Desweiteren müßte die proximale  $\alpha$ 1,3-Fucosylierung (High Five) unterbunden und die GlcNAcase-Aktivität deutlich vermindert werden. Wenn es überhaupt gelingen sollte, eine solche Zelllinie zu etablieren, so erscheint es als sehr unwahrscheinlich, daß diese stabil genug ist, rekombinante Glycoproteine im großen Maßstab zu produzieren.

Trotz dieser in der vorliegenden Arbeit näher aufgedeckten Engpässe, die das

Baculovirus-Expressionssystem aufweist, wird dieses Expressionssystem aufgrund seiner einfachen Handhabbarkeit und wegen des geringen Zeitaufwandes, der benötigt wird, um einige hundert mg gewünschter rekombinanter Proteine zu produzieren, seinen festen Platz in der modernen Biotechnologie behalten.

## 5. Literaturverzeichnis

Acharya, A.S., Taniuchi, H. (1976) A study on renaturation of reduced hen egg lysozyme.  
J. Biol. Chem. **251**: 6934-6946

Ackermann, M (1995) Untersuchungen zur Produktionsoptimierung und Produktintegrität rekombinanter Glycoproteine aus dem Baculovirus-Expressionssystem.  
Dissertation, TU Braunschweig

Aeed, P.A., Elhammer, A.P. (1994) Glycosylation of recombinant prorenin in insect cells: The insect cell line Sf9 does not express the mannose 6-phosphate recognition signal.  
Biochemistry **33**: 8793-8799

Ailor, E., Betenbaugh, M.J. (1998) Overexpression of a cytosolic chaperone to improve solubility and secretion of a recombinant IgG protein in insect cells.  
Biotechnol. Bioeng. **58**: 196-203

Ailor, E., Pathmanathan, J., Jongbloed, J.D.H., Betenbaugh, M.D. (1999) A bacterial signal peptidase enhances processing of a recombinant single chain antibody fragment in insect cells.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. **255**: 444-450

Alnemri, E.S., Litwack, G. (1993) The steroid binding domain influences intracellular solubility of the baculovirus overexpressed glucocorticoid and mineralcorticoid receptors.  
Biochemistry **32**: 5387-5393

Altmann, F., Kornfeld, G., Dalik, T., Staudacher, E., Glössl, J (1993) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells. N-acetylglucosaminyltransferase I and II activities in cultured lepidopteran cells.  
Glycobiology **3**: 619-625

Altmann, F., März, L. (1995) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells: Evidence for alpha-mannosidase II.  
Glycoconj. J. **12**: 150-155

Altmann, F., Staudacher, Wilson, I.B.H., März, L. (1999) Insect cells as host for the expression of recombinant glycoproteins.  
Glycoconj. J. **16**: 109-123



Altmann, F., Schwihla, H., Staudacher, E. Glössl, J., März, L. (1995) Insect cells contain an unusual, membrane-bound  $\beta$ -N-acetylglucosamidase probably involved in the processing of protein N-glycans.

J. Biol. Chem. **270**: 17344-17349

Anderson L. (1991) Two-dimensional Electrophoresis. Operation of the iso-DALT system. 2. Ed. Large Scale Biology Press, Rockville, MD

Anderson, W.L., Wetlaufer, D.B. (1976) The folding pathway of reduced lysozyme.

J. Biol. Chem. **251**: 3147-3153

Balch, R.E., Bird, F.T. (1944) A disease of the european spruce sawfly, *Gilpinia hercyniae* (Htg.) and its place in natural control.

Sci. Agric. **25**: 65-91

Baumert, T.F., Ito, S., Wong, D.T., Liang, T.J. (1998) Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells.

J. Virol. **72**: 3827-3836

Belyaev, A.S. Hails, R.S., Roy, P. (1995) High level expression of five foreign genes by a single recombinant baculovirus.

Gene **156**: 229-233

Benz, G.A. (1986) Introduction: Historical perspective. In: The biology of baculoviruses R.R. Granados, and B.A. Federici (Hrsg.), Biological properties and molecular biology, CRC Press, Boca Raton, FL. Vol.I: 1-35

Bergmann, L.W., Kuehl, W.M. (1979) Formation of an intrachain disulfide bond on nascent immunoglobulin light chains.

J. Biol. Chem. **254**: 8869-8876

Bergold, G. (1953) Insect viruses

Adv. Virus Res. **1**: 91-123

Berkelmann, T., Stenstedt, T. (1998) 2-D-electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles Methods. Amersham Pharmacia Biotech Inc., Freiburg, 80-6429-60, Rev A / 10-98

Bernard, A.R., Kost, T.A., Overton, L., Cavegn, C., Young, J., Bertrand, M., Yahia-Cherif, Z., Chabert, C., Mills, A. (1994) Recombinant protein expression in a *Drosophila* cell line: Comparison with the baculovirus expression system.

Cytotechnology **15**: 139-144

Bilimoria, S.L. (1986) Taxonomy and identification of baculoviruses, In: The biology of baculoviruses, R.R. Granados, B.A. Federici, (Hrsg.), Biological properties and molecular biology, CRC Press, Boca Raton, FL. Vol.I: 37-60

Blissard, G.W. (1996) Baculovirus - insect cell interactions.  
Cytotechnology **20**: 73-93

Blissard, G.W., Rohrmann, G.F. (1989) Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus.  
Virology **170**: 537-555

Blissard, G.W., Rohrmann, G.F. (1990) Baculovirus diversity and molecular biology.  
Annu. Rev. Entomol. **35**: 127-157

Blissard, G.W., Wenz, J.R. (1992) Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion.  
J. Virol. **66**: 6829-6835

Blobel, G., Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes.  
J. Cell Biol. **67**: 835-851

Blohm, D., Bollschweiler, C., Hillen, H. (1988) Pharmaproteine.  
Angew. Chem. **100**: 213-231

Bloom, W., Fawcett, D.W. (1994) A textbook of histology, Chapman & Hall, New York, London: 22

Boni. P.C., Deshaies, R.J. Schekman, W. (1988) Sec11 is required for signal peptide processing and yeast cell growth.  
J. Cell Biol. **106**: 1035-1042

Boose, J.A., Tifft, C.J., Proia, R.A. Myerowitz, R. (1990) Synthesis of a human lysosomal enzyme, beta-hexosamidase B, using the baculovirus expression system.  
Protein Expr. Purif. **1**: 111-118

Boyce, F.M., Bucher, N.L.R. (1996) Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 2348-2352

Broussard, D.R., Guarino, L.A., Jarvis, D.L. (1996) Mapping functional domains in AcMNPV pp31.  
Virology **222**: 318-326

Brown, M., Faulkner, P. (1977) A plaque assay for the nuclear polyhedrosis virus using solid overlay.

J. Gen. Virol. **36**: 361-364

Bulleid, N.J., Freedmann, R.B. (1988) Defective co-translational formation of disulfide bonds in protein-disulfide-isomerase-deficient microsomes.

Nature **335**: 649-651

Carstens, E.B., Tjia, S.T., Doerfler, W. (1980) Infectious DNA from *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus.

Virology **101**: 311-314

Charlton, C.A., Volkmann, L.E. (1993) Baculoviruses, vertebrate viruses, and cytoskeletons, In: Parasites and Pathogenes of Insects, N.E.Beckage, S.N. Thompson, and B.A. Frederici (Hrsg.) Academic Press, San Diego, Vol.II: 103-125

Cheley, S., Kosik, K.S., Paskevich, P., Bakalis, S., Bayley, H. (1992) Phosphorylated baculovirus p10 is a heat-stable microtubule-associated protein associated with process formation in Sf9 cells.

J. Cell. Sci. **102**: 739-752

Chico, E.R., Jäger, V. (2000) Perfusion culture of baculovirus-infected BTI-Tn-5B1-4 insect cells: A method to restore cell-specific  $\beta$ -trace glycoprotein productivity at high cell density.

Biotechnol. Bioeng **70**: 574-586

Cohen, S., Chang, A., Boyer, H., Helling, R. (1973) Construction of biotechnologically functional bacterial plasmids in vitro.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**: 3240-3244

Creighton, T.E. (1975) Interactions between cysteine residues as probes of protein conformation: The disulfide bond between Cys-14 and Cys-38 of the pancreatic trypsin inhibitor.

J. Mol. Biol. **96**: 767-780

Creighton, T.E. (1984) Disulfide bond formation in proteins.

Methods Enzymol. **107**: 305-329

Cronin, J.T., Hare, P.E. (1977) Chromatographic analysis of amino acids and primary amines with o-phthalaldehyde detection.

Anal. Biochem. **81**: 151-156

Dalbey, R.E., Wickner, W. (1985) Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of *Escherichia coli* membrane  
J. Biol. Chem. **260**: 15925-15931

Davidson, D.J., Castellino, F.J. (1990) Oligosaccharide processing in the expression of human plasminogen cDNA by lepidopteran insect (*Spodoptera frugiperda*) cells.  
Biochemistry **29**: 5584-5590

Davidson, D.J., Castellino, F.J. (1991) Asparagine-linked oligosaccharides processing in lepidopteran insect cells. Temporal dependence of the nature of the oligosaccharides assembled on asparagine-289 of recombinant human plasminogen produced in baculovirus vector infected *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AE) cells.  
Biochemistry **30**: 6167-6174

Davis, T.R., Wickham, T.J., McKenna, K.A., Granados, R.R., Shuler, M.L., Wood, H.A. (1993) Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines.  
In Vitro Cell. Dev. Biol. **29A**: 388-399

Davis, T.R., Wood, H.A. (1995) Intrinsic glycosylation potentials of insect cell cultures and insect larvae.  
In Vitro Cell. Dev. Biol. **31**: 659-663

Donaldson, M., Wood, H.A., Kulakosky, P.C. (1999) Glycosylation of a recombinant protein in the Tn5B1-4 insect cell line: Influence of ammonia, time of harvest, temperature, and dissolved oxygen.  
Biotechnol. Bioeng. **63**: 255-262

Dubois, T., Guillard, R., Prieels, J.P., Perraudin, J.P. (1982) Comparison between the folding of reduced hen egg white lysozyme and that of reduced human milk lysozyme.  
Biochemistry **21**: 6516-6523

Ellgaard, L., Molinari, M., Helenius, A. (1999) Setting the standards: Quality control in the secretory pathway.  
Science **286**: 1882-1888

Ellmann, G.L. (1958) A colorimetric method for determining low concentration of mercaptans.  
Arch. Biochem. Biophys. **74**: 443-450

Emery, V.C., Bishop, D.H.L. (1987) The development of multiple expression vectors for high level synthesis of eukaryotic proteins: Expression of LCMV-N and AcNPV polyhedrin protein by recombinant baculovirus.  
Prot. Eng. **1**: 159-366

- Engelhard, E.K., Kam-Morgan, L.N.W., Washburn, J.O., Volkmann, L.E. (1994) The insect tracheal system: A conduit for the systemic spread of *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 3224-3227
- Evans, E.A., Gilmore, R., Blobel, G. (1986) Purification of microsome signalpeptidase as a complex.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 581-585
- Flipsen, J.T.M., van Lent, J.W.M., Goldbach, R.W., Vlak, J.M. (1993) Expression of polyhedrin and p10 in the midgut of AcMNPV-infected *Spodoptera exigua* larvae: An immunoelectron microscope investigation.  
J. Invertebr. Pathol. **61**: 17-23
- Fraser, M.J. (1986) Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures.  
J. Ultrastruc. Mol. Struc. Res. **95**: 189-195
- Frederici, B.A. (1997) Baculovirus Pathogenesis. In: L.K. King, (Hrsg.) „The Baculoviruses“, Plenum Press, New York, 33-59
- Freedmann, R.B., Brockway, B.E., Lambert, N. (1984) Protein disulfide isomerase and the formation of native disulfide bonds.  
Biochem. Soc. Trans. **12**: 929-932
- Fujiwara, T.K., Oda, S., Yokota, A., Takatsuki, A., Ikehara, Y. (1988) Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum.  
J. Biol. Chem. **263**: 18545-18552
- Gething, M.J., McCannon, K., Sambrook, J. (1986) Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: The role of folding in intracellular transport.  
Cell **46**: 939-950
- Gierasch, L.M. (1989) Signal sequences.  
Biochemistry **28**: 923-930
- Giese, N., May-Siroff, M., LaRochelle, W.J., van Wyke Coelingh, K., Aaronson, S.A. (1989) Expression and purification of biologically active v-sis/platelet-derived growth factor B protein by using a baculovirus vector system.  
J. Virol. **63**: 3080-3087

Görg A., Postel, W., Günther, S. (1985) Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focussing in immobilized pH-gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension.

Electrophoresis **6**: 599-604

Grabenhorst, E. (1994) „Genetic engineering“ Transfer von Glycosylierungsdomänen humaner Proteine, Charakterisierung der Produkte nach Expression in eukaryontischen Wirtszellen.

Dissertation TU-Braunschweig

Grabenhorst, E., Hofer, B., Nimtz, M., Jäger, V., Conradt, H.S. (1993) Biosynthesis and secretion of human interleukin-2 glycoprotein variants from baculovirus-infected Sf21 cells.

Eur. J. Biochem. **215**: 189-197

Grabenhorst, E., Hoffmann, A., Nimtz, M., Zettelmeißl, G., Conradt, H.S. (1995) Construction of stable BHK-21 cells coexpressing human secretory glycoproteins and human Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc-R' U 2,6-sialyltransferase: U 2,6-linked NeuAc is preferably attached to the Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-2Man U 1-3-branch of biantennary oligosaccharides from secreted recombinant  $\beta$ -trace protein.

Eur. J. Biochem. **232**: 718-725

Grabenhorst, E., Schlenke, P., Pohl, S., Nimtz, M., Conradt, H.S. (1999) Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells.

Glycoconj. J. **16**: 81-97

Granados, R.R. (1978) Early Events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus.

Virology **90**: 170-174

Granados, R., Hashimoto, Y. (1989) Infectivity of baculoviruses to cultured cells.

Invertebrate Cell System Applications **2**: 3-13

Granados, R.R., Lawler, K.A. (1981) In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection.

Virology **108**: 297-308

Granados, R.R., Williams, K.A. (1986) In vivo infection and replication of baculoviruses. In: Granados, R.R., Frederici, B.A. (Hrsg.) „The Biology of Baculoviruses I: Biological properties and molecular biology“ CRC Press, Boca Raton, FL.: 89-108

Gunne, H., Hellers, M., Steiner, H. (1990) Structure of preproattacin and its processing in insect cells infected with a recombinant baculovirus.

Eur. J. Biochem. **187**: 699-703

Hakomori, S. (1964) A rapid permethylation of lyxolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinylcarbanion indimethyl sulfoxide.

J. Biol. Chem. **55**: 205-207

Hardy M.R., Townsend P.R., (1988) Separation of positional isomers of oligosaccharides and glycopeptides by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 3289-3298

Harrap, K.A. (1972) The structure of nuclear polyhedrosis viruses. III. Virus assembly. Virology **50**: 133-139

Hasegawa, M., Orita, T., Kojima, T., Tomonoh, K., Hirata, Y., Ochi, N. (1992) Improvement in the heterogeneous N-termini and the defective N-glycosylation of human interleukin-6 by genetic engineering.

Eur. J. Biochem. **210**: 9-12

Hasemann, C.A., Capra, J.D. (1990) High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 3942-3946

Heidemann, R., Riese, U., Lütkemeyer, D., Büntemeyer, H., Lehmann, J. (1994) The superspinner: A low cost animal cell culture bioreactor for the CO<sub>2</sub> incubator.

Cytotechnology **14**: 1-9

Helenius, A. (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum.

Mol. Biol. Cell **5**: 253-265

Hill-Perkins, M.S., Possee, R.D. (1990) A baculovirus expression vector derived from the basic protein promotor of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.

J. Gen. Virol. **71**: 971-976

Hink, W.F., Thomsen, D.R., Davidson, D.J., Meyer, A.L., Castellino, F.J. (1991) Expression of three recombinant proteins using baculovirus vectors in 23 insect cell lines.

Biotechnol. Prog. **7**: 9-14

Hoffmann, A. (1992) Isolierung und chemische Charakterisierung des  $\beta$ -Trace Proteins aus menschlichem Liquor cerebrospinalis: Identifikation als Prostaglandin D Synthase. Dissertation, Universität Hannover

Hoffmann, A., Conradt, H.S., Gross, G., Nimtz, M., Lottspeich, F., Wurster, U. (1993) Purification and chemical characterization of  $\beta$ -trace-protein from human cerebrospinal fluid: Its identification as prostaglandin D synthase. J. Neurochem. **61**: 451-456

Hoffmann, A., Nimtz, M., Wurster, U., Conradt, H.S. (1994) Carbohydrate structure of  $\beta$ -trace protein from human cerebrospinal fluid: Evidence for 'brain-type' N-glycosylation. J. Neurochem. **63**: 2185-2196

Hoffmann, C., Sandig, V., Jennins, G., Rudolph, M., Schlag, P., Strauss, M. (1995) Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**:10099-10103

Hollister, J.R., Shaper, J.H., Jarvis, D.L. (1998) Stable expression of mammalian  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase extends the N-glycosylation pathway in insect cells. Glycobiology **8**: 473-480

Hooker, A.D., Green, N.H., Baines, A.J., Bull, A.T., Jenkins, N., Strange, P.G., James, D.C. (1999) Constraints on the transport and glycosylation of recombinant IFN- $\gamma$  in chinese hamster ovary and insect cells. Biotechnol. Bioeng. **63**: 559-572

Horton, H.M., Burand, J.P. (1993) Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and the evidence for entry via direct membrane fusion. J. Virol. **67**: 1860-1868

Hsu, T.A. Eiden, J.J., Betenbaugh, M. (1994) Engineering the assembly pathway of the baculovirus-insect cell expression system. Ann. New York Acad. Sci. **721**: 208-217

Hsu, T.A. Eiden, J.J., Bourgarel, P., Meo, T., Betenbaugh, M. (1994) Effects of co-expressing chaperone BiP on functional antibody production in the baculovirus system. Prot. Expr. Purif. **5**: 595-603

Hsu, T.A., Takahashi, N., Tsukamoto, Y., Kato, K., Shimada, I., Masuda, K., Whiteley, E.M., Fan, F.Q., Lee, Y.C., Betenbaugh, M.J. (1997) Differential N-Glycan patterns of secreted and intracellular IgG produced in *Trichoplusia ni* cells. J. Biol. Chem. **272**: 9062-9070



Hsu, T.A., Watson, S., Eiden, J.J., Betenbaugh, M.J. (1996) Rescue of Immunoglobulins from insolubility is facilitated by PDI in the baculovirus expression system.

Protein Expr. Purif. **7**: 281-288

Hughes, R.C. (1991) Processing and re-processing of asparagine-linked oligosaccharides. In: Protein Glycosylation: Cellular, biotechnological and analytical aspects Conradt, H.S. (Hrsg.), GBF monographs, VCH Publishers, Weinheim, New York, **15**: 3-11

Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D. (1977) Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone Somatostatin.

Science **198**: 1056-1063

Jäger, V, Chico, E., Ackermann, M., Nimtz, M., Grabenhorst, E., Conradt, H.S. (1998) High yield production of recombinant glycoproteins in baculovirus-infected insect cells. Proc. Int. GlycoBioTechnology Symp. Braunschweig: L13

Jäger V., Kobold, A. (1995) Propagation of *Spodoptera frugiperda* cells (Sf9) and production of recombinant proteins with the baculovirus expression system using improved spinner flasks with membrane aeration.

Biotechnol. Techniques **9**: 435-440

Jain, R.G., Rusch, S.L., Kendall, D.A. (1994) Signal peptide cleavage regions. Functional limits on length and topological implications.

J. Biol. Chem. **269**: 16305-16310

Jakob, C.A., Burda, P., Roth, J., Aepli, M. (1998) Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure.

J. Cell Biol. **142**:1223-1233

Jarvis, D.L. (1993) Effects of baculovirus infection on IE1-mediated foreign gene expression in stably transformed insect cells.

J. Virol. **67**: 2383-2391

Jarvis, D.L., Finn, E.E. (1995) Modifying the insect cell N-glycosylation pathway with immediate early baculovirus expression vectors.

Nature Biotechnol. **14**: 1288-1292

Jarvis, D.L., Fleming, J.G.W., Kovacs, G.R. Summers, M.D., Guarino, L.A. (1990) Use of baculovirus promoters for continuous expression of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells.

Bio/Technology **8**: 950-955

Jarvis, D.L., Garcia Jr., A. (1994) Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis gp64 protein.

Virology **205**: 300-313

Jarvis, D.L., Summers, M.D. (1989) Glycosylation and secretion of human plasminogen activator in recombinant baculovirus-infected insect cells.

Mol. Cell. Biochem. **9**: 214-223

Jarvis, D.L., Summers, M.D., Garcia, A., Bohlmeier, D.A. (1993) Influence of different signal peptides and prosequences on expression and secretion of human tissue plasminogen activator in the baculovirus expression system.

J. Biol. Chem. **268**: 16754-16762

Jarvis, D.L., Weinkauff, C., Guarino, L.A. (1996) Immediate early baculovirus vector for foreign gene expression in transformed or infected insect cells.

Prot. Expr. Purif. **8**: 191-203

Jenkins, N., Curling, E.M.A. (1994) Glycosylation of recombinant proteins: Problems and prospects.

Enzyme Microb. Technol. **16**: 354-364

Kelly, DC, Brown, D.A., Ayes, M.D., Allen, C.J., Walker, I.O. (1983) Properties of the major nucleocapsid protein of *Heliothis zea* single enveloped nuclear polyhedrosis virus.

J. Gen. Virol. **64**: 399-408

Knepper, T.P., Arbogast, B., Schreurs, J. Deinzer, M.L. (1992) Determination of the glycosylation patterns, disulfide linkages, and protein heterogeneities of baculovirus-expressed mouse interleukin-3 by mass spectrometry.

Biochemistry **54**: 11651-11659

Kornfeld R., Kornfeld S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides.

Annu. Rev. Biochem. **54**: 631-664

Korth, K.L., Levings, C.S. (1993) Baculovirus expression of the maize mitochondrial protein URF13 confers insecticidal activity in cell cultures and larvae.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 3388-3392

Kukelka, V., Altmann, F., Kornfeld, G., März, L. (1994) Structures of the N-linked oligosaccharides of the membrane glycoproteins from three lepidopteran cell lines (Sf-21, IZD-Mb-0503, Bm-N).

Arch. Biochem. Biophys. **308**: 148-157

Kukelka, V., Altmann, F., Staudacher, E., Tretter, V., März, L., Hard, K., Vliegenthart (1993) Primary structures of the N-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A2.

Eur. J. Biochem. **213**: 1193-1204

Kulakosky, K.L., Hughes, P.R., Wood, H.A. (1998) N-linked glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in insect larvae and tissue culture cells.

Glycobiology **8**: 741-745

Kuroda, K., Groner, A., Frese, K., Drenckhahn, D., Hauser, C. Rott, R., Doerfler, W., Klenk, H.D. (1989) Synthesis of biologically active influenza virus hemagglutinin in insect larvae.

J. Virol. **63**: 1677-1685

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature **227**: 680-685

Kyse-Anderson, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose.

J. Biochem. Biophys. Methods **10**: 203-209

Lebacqz-Verheyden, J.A., Kasprzyk, P.G., Raum, M.G., Van Wyke Coelingh, K., Lebacqz, J.A., Battey, J.F. (1988) Posttranslational processing of endogenous and of Baculovirus-expressed human gastrin-releasing peptide precursor.

Mol. Cell. Biol. **8**: 3129-3135

Lehmann, J., Piehl, G.W., Schulz, R. (1985) Blasenfreie Zellkulturbegasung mit bewegten, porösen Membranen.

Biotech-Forum **2**: 112-118

Lehmann, J., Piehl, G.W., Schulz, R. (1987) Bubble free cell culture aeration with porous moving membranes.

Develop. Biol. Standard. **66**: 227-240

Lenhard, T., Reiländer, H. (1997) Engineering the folding pathway of insect cells: Generation of a stably transformed insect cell line showing improved folding of a recombinant membrane protein.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **238**: 823-830

Link, H. (1967) Immunoglobulin G and low molecular weight proteins in human cerebrospinal fluid.

J. Neurol. Scand. **43**, Suppl. 28, 1-136

Liu, Y., Choudhury, P., Cabral, C.M., Sifers, R.N. (1999) Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the secretion of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome.

J. Biol. Chem. **274**: 5861 -5867

Lodish, H.F. (1988) Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi.

J. Biol. Chem. **263**: 2107-2110

Luckow, V.A., Summers, M.D. (1988) Trends in the development of baculovirus expression vectors.

Bio/Technology **6**: 47-55

Mackinnon, E.A., Henderson, J.F., Stoltz, D.B., Faulkner, P. (1974) Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage in vitro.

J. Ultrastruc. Res. **49**: 419-435

Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y., Furasawa, M. (1985) Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector.

Nature **315**: 592-594

Marchal, I., Mir, A.M., Kmiecik, A.V., Rene, C. (1999) Use of inhibitors to characterize intermediates in the processing of N-glycans synthesized by insect cells: A metabolic study with Sf9 cell line.

Glycobiology **9**: 645-654

Martignoni, M.E. (1984) Baculovirus: An attractive biological alternative. In : Chemical and Biological Controls in Forestry, W.Y. Garner and J. Harvey (Hrsg.), American Chemical Society, Washington, DC, 55-67

McCarroll, L., King, L.A. (1997) Stable insect cell cultures for recombinant protein production.

Curr. Opin. Biotechnol. **8**: 590-594

Miller, L.K. (1988) Baculoviruses as gene expression vectors.  
Annu. Rev. Microbiol. **42**: 177-199

Milstein, C., Brownlee, G.G., Harrison, T.M., Mathews, M.B. (1972) A possible precursor of immunoglobulin light chains.  
Nature New Biol. **239**: 117-120

Mizrahi, A. (1986) Biologicals from animal cells in culture.  
Bio/Technology **4**: 123-127

Monsma, S.A., Oomens, A.G.P., Blissard, G.W. (1996) The gp64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission and infection.  
J. Virol. **70**: 4607-4616

Nagata, A., Suzuki, Y., Igarashi, M., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y., Hayaishi, O. (1991) Human brain prostaglandin D synthase has been evolutionarily differential from lipophilic-ligand carrier proteins.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 4020-4024

Nakhai, B., Pal, R., Sridhar, P. Talwar, G.P., Hasnain, S.E. (1991) The  $\alpha$  subunit of human gonadotropin hormone synthesized in insect cells using a baculovirus vector is biologically active.  
FEBS. Lett. **283**: 104-108

Noble, M. Lewis, S.A., Cowan, N.J. (1989) The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau.  
J. Cell Biol. **109**: 3367-3376

O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.  
J. Biol. Chem. **250**: 4007-4021

Ogonah, O.W., Freedmann, R.B., Jenkins, N., Patel, K., Rooney, B.C. (1996) Isolation and characterization of an insect cell line able to perform complex N-linked glycosylation on recombinant proteins.  
Bio/Technology **14**: 197-202

Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis.  
Science **189**: 347-358

Parker, C.G., Fessler, L.I., Nelson, R.E., Fessler, J.H. (1995) *Drosophila* UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase: Sequence and characterization of an enzyme that distinguishes between denatured and native proteins.

EMBO J. **14**: 1294-1303

Patterson, S.D., Katta, V. (1994), Prompt fragmentation of disulfide-linked peptides during matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry.

Anal. Chem. **66**: 3737-3742

Pohl, S., Hoffmann, A., Rüdiger, A., Nimtz, M., Jaeken, J., Conradt, H.S. (1997) Hypoglycosylation of a brain glycoprotein ( $\beta$ -trace protein) in CDG syndromes due to phosphomannomutase deficiency and N-acetylglucosaminyl-transferase II deficiency. Glycobiology **7**: 1077-1084

Rapoport, T.A. (1992) Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane.

Science **258**: 931-936

Reis, U., Blum, B., von Specht, B.U., Domdey, H., Collins, J. (1992) Antibody production in silkworm cells and silkworm larvae infected with a dual recombinant *Bombyx mori* nuclear-polyhedrosis virus.

Bio/Technology **10**: 910-912

Ren, J.X., Castellino, F.J., Bretthauer, R.K. (1997) Purification and properties of alpha-mannosidase II from golgi-like membranes of baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AE) cells.

Biochem. J. **324**: 951-956

Rohrmann, G.F. (1986) Polyhedrin structure.

J. Gen. Virol. **67**: 1499-1513

Roncarati, R., Knebel-Mörsdorf, D. (1997) Identification of the early actin-rearrangement-inducing factor gene, arif-1, from *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus.

J. Virol. **71**: 7933-7941

Roth, R., Pierce, S. (1987) In vivo cross-linking of protein disulfide isomerase to immunoglobulins.

Biochemistry **26**: 4179-4182

Rothmann, J.E. (1994) Mechanism of intracellular protein transport.

Nature **372**: 55-63

Sanders, S.L., Scheckmann, R.J. (1992) Polypeptide translocalisation across the endoplasmic reticulum membrane.

J. Biol. Chem. **267**: 13791-13794

Schachter, H. (1991) The 'yellow brick road' to branched complex N-glycans.

Glycobiology **1**: 453-461

Schulze, N. (1996) Einfluß von Proteaseinhibitoren auf die Integrität Baculovirus-exprimierter rekombinanter Proteine.

Diplomarbeit, TU Braunschweig

Shuler, M.S. (1995) Comparison of mammalian and insect cell cultures. In: Baculovirus expression systems and biopesticides (Shuler, M.S., Wood, A., Granados, R.R., Hammer, D.A.) (Hrsg.) Wiley-Liss, New York, 41-49

Shuler, M.S., Hammer, D.A., Granados, R.R., Wood, H.A. (1995) Overview of baculovirus-insect culture system. In: Baculovirus expression systems and biopesticides (Shuler, M.S., Wood, A., Granados, R.R., Hammer, D.A.) (Hrsg.) Wiley-Liss, New York, 1-11

Sissom, J., Ellis, L. (1989) Secretion of the extracellular domain of the human insulin receptor from insect cells by use of a baculovirus vector.

Biochem. J. **261**: 119-126

Slack, J.M., Kuzio, J., Faulkner, P. (1995) Characterization of v-cath, cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus.

J. Gen. Virol. **76**: 1091-1098

Smith, G.E., Fraser, M.J., Summers, M.D. (1983) Molecular engineering of the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus genome: Deletion mutations within the polyhedrin gene.

J. Virol. **46**: 584-593

Smith, G.E., Ju, G., Ericson, B.L., Moschera, J., Lahm, H.M., Chizzonite, R., Summers, M.D. (1985) Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector.

Proc. Natl. Sci. USA **82**: 8404-8408

Smith, G.E., Summers, M.D., Fraser, M.J. (1983) Production of human  $\beta$ -Interferon in insect cells with a baculovirus expression vector.

Mol. Cell. Biol. **3**: 2156-2165

Smith, G.E., Summers, M.D. (1978) Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases.

Virology **89**: 517-527

Snider, M.D. (1984) Biosynthesis of glycoproteins: Formation of N-linked oligosaccharides. In: V. Ginsburg, P.W. Robbins (Hrsg.) „Biology of Carbohydrates“ Volume 2, Chapter 3, John Wiley & Sons, New York

Stacey, G., Possee, R. (1996) Safety aspects of insect cell culture.  
Cytotechnology **20**: 299-304

St. Angelo, C., Smith, G.E., Summers, M.D., Krug, R.M. (1987) Two of the three influenza viral polymerase proteins expressed by using baculovirus vectors form a complex in insect cells.

J. Virol. **61**: 361-365

Staudacher, E., Altmann, F., März, L., Kamerling, J.P., Hard, K., Vliegenthart, J.F.G. (1992) Alpha 1-6(alpha 1-3)-difucosylation of the asparagine-bound N-acetylglucosamine in honeybee venom phospholipase A2.

Glycoconj. J. **9**: 82-85

Staudacher, E., März, L. (1998) Strict order of (Fuc to Asn-linked GlcNAc) fucosyltransferases forming core-difucosylated structures.

Glycoconj. J. **15**: 355-360

Stern, L.J., Wiley, D.C. (1992) The human class II MHC HLA-DR1 assembles as empty  $\alpha\beta$  heterodimers in the absence of antigenic peptide.

Cell **68**: 465-477

Takagi, Y., Ogawa, H., Harada, N., Shimada, H., Ishimura, Y., Takagi, Y. (1992) Expression and transport into mitochondria of bovine cytochrome P-450 (SCC) in insect cells using the baculovirus expression system.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **184**: 471-476

Takahashi, N., Tsukamoto, Y., Shiosaka, S., Kishi, T., Hakoshima, T., Arata, Y., Yamaguchi, Y., Kato, K., Shimada, I. (1999) N-glycan structures of murine hippocampus serine protease, neuropsin, produced in *Trichoplusia ni* cells.

Glycocon. J. **16**: 405-414

Tessier, D.C., Thomas, D.Y., Khouri, H.E., Laliberte, F., Vernet, T. (1991) Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide.

Gene (Amst.) **98**: 177-183



Thiem, S.M., Miller, L.K. (1989) Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.

J. Virol. **63**:2008-2018

Tweeten, K.A., Bulla, L.A., Consigli, R.A. (1980) Characterization of an extremely basic protein derived from granulosis virus nucleocapsid.

J. Virol. **33**: 866-876

Urade, Y., Tanaka, T., Eguchi, N., Kikuchi, M., Kimura, H., Toh, H., Hayaishi, O. (1995) Structural and functional significance of cysteine residues of glutathione-independent prostaglandin D synthase.

J. Biol. Chem. **270**: 1422-1428

Vail, P.V., Sutter, G., Jay, D.L., Gough, D. (1971) Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis viruses of the cabbage looper and alfalfa looper.

J. Invertebr. Pathol. **17**: 383-388

Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., McCawley, P. (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae).

In Vitro **13**: 213-217

Veijola, J., Pihlajaniemi, T., Kivirikko, K.I. (1996) Co-expression of the  $\alpha$ -subunit of human prolyl 4-hydrolase with BiP polypeptide in insect cells leads to the formation of soluble and insoluble complexes.

Biochem. J. **315**: 613-618

Velardo, M.A., Bretthauer, R.K., Boutaud, A., Reinhold, B., Reinhold, V.N., Castellino F.J. (1993) The presence of UDP-N-acetylglucosamine:  $\alpha$ -3-D-mannoside beta 1,2,-N-acetylglucosaminyltransferase I activity in *Spodoptera frugiperda* cells (IPLB-SF-21AE) and its enhancement as a result of baculovirus infection.

J. Biol. Chem. **268**: 17902-17907

Vlak, J.M., Schouten, A., Usmany, M., Belsham, G.J. Kingle-Roode, E.C., Maule, A.J., van Lent, J.W., Zuidema, D. (1990) Expression of cauliflower mosaic virus gene I using baculovirus vector based upon the p10 gene and a novel selection method.

Virology **179**: 312-320

Vliegenthart, J.F.G. Hard, K., de Waard, P., Kamerling, J.P. (1991) Studies on the structure of carbohydrate chains of glycoproteins. In: Protein Glycosylation: Cellular, Biotechnological and Analytical Aspects. Hrsg. Conradt, H.S., GBF Monographs, VCH Publishers, Weinheim, **15**: 137-146

Volkman, L.E., Knudsen, D.L. (1986) In vitro replication of baculoviruses. In: The biology of baculoviruses Granados, R.R. Federici, B.A. (Hrsg.), Biological properties and molecular biology, CRC Press, Boca Raton, FL. Vol.I: 109-128

Volkman, L.E., Zaal, K.J.M. (1990) *Autographa californica* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus: Microtubules and Replication. Virology **175**: 292-302

von Heijne, G. (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. Eur. J. Biochem. **133**: 17-21

von Heijne, G. (1985) Signal sequences. The limits of variation. J. Mol. Biol. **184**: 99-105

Wagner, R., Geyer, H., Geyer, R., Klenk, H.D. (1996) N-Acetyl- $\beta$ -glucosamidase accounts for differences in glycosylation of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells from a baculovirus vector. J. Virol. **70**: 4103-4109

Walford, R.L., Gillagher, R., Sjaard, J.R. (1964) Sereolytic typing of human lymphocytes with immune serum obtained after homografting. Science **141**: 868-870

Wang, X.Z., Ooi, B.G., Miller, L.K. (1991) Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production. Gene **100**: 131-137

Warren, G., Mellman, I. (1999) Bulk Flow Redux? Cell **98**: 125-127

Wickham, T.J., Davis, T., Granados, R.R., Shuler, M.L., Wood, H.A. (1992) Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. Biotechnol. Prog. **8**: 391-396

Wickham, T.J., Nemerow, G.R., (1993) Optimization of growth methods and recombinant protein production in BTI-Tn-5B1-4 insect cells using the baculovirus expression system. Biotechnol. Prog. **9**: 25-30

Wickner, S., Maurizi, M.R., Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins. Science **286**: 1888-1893

Wickner, W., Driessen, A.J.M., Hartl, F.U. (1991) The enzymology of protein translocalisation across the *Escherichia coli* plasma membrane.

Annu. Rev. Biochem. **60**: 101-124

Williams, G.V., Rohel, D.Z., Kuzio, J., Faulkner, P., (1989) A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants.

J. Gen. Virol. **70**: 187-202

Williams, G.V., Faulkner, P. (1996) Replication patterns and cytopathology of cells infected with baculoviruses.

Cytotechnology **15**: 95-110

Wilson, M.E., Mainprize, T.H., Friesen, P.D., Miller, L.K., (1987) Location, transcription, and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide.

J. Virol. **61**: 661-666

Wirth, M., Hauser, H. (1993) Genetic engineering of animal cells. In: Rehm, H.J., Reed, A., Pühler, A., Stadler, P (Hrsg.) „Biotechnology“ VCH, Weinheim, 665-744

Wood, H.A. (1995) Development and testing of genetically improved baculovirus insecticides. In: Baculovirus expression systems and biopesticides. Shuler, M., Wood, H.A., Granados, R.R., Hammer, D.A. (Hrsg.), Wiley-Liss, New York, 91-103

Xie, Y.B., Sui, Y.P., Shan, L.X., Palvimo, J.J., Phillips, D.M. Jänne, O.A. (1992) Expression of androgen receptor in insect cells. Purification of the receptor and renaturation of its steroid- and DNA-binding functions.

J. Biol. Chem. **267**: 4939-4948

Young, J.C., Mackinnon, E.A., Faulkner, P. (1993) The architecture of the virogenic stroma in isolated nuclei of *Spodoptera frugiperda* cells in vitro infected by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.

J. Struct. Biol. **110**: 141-153

## 6. Anhang

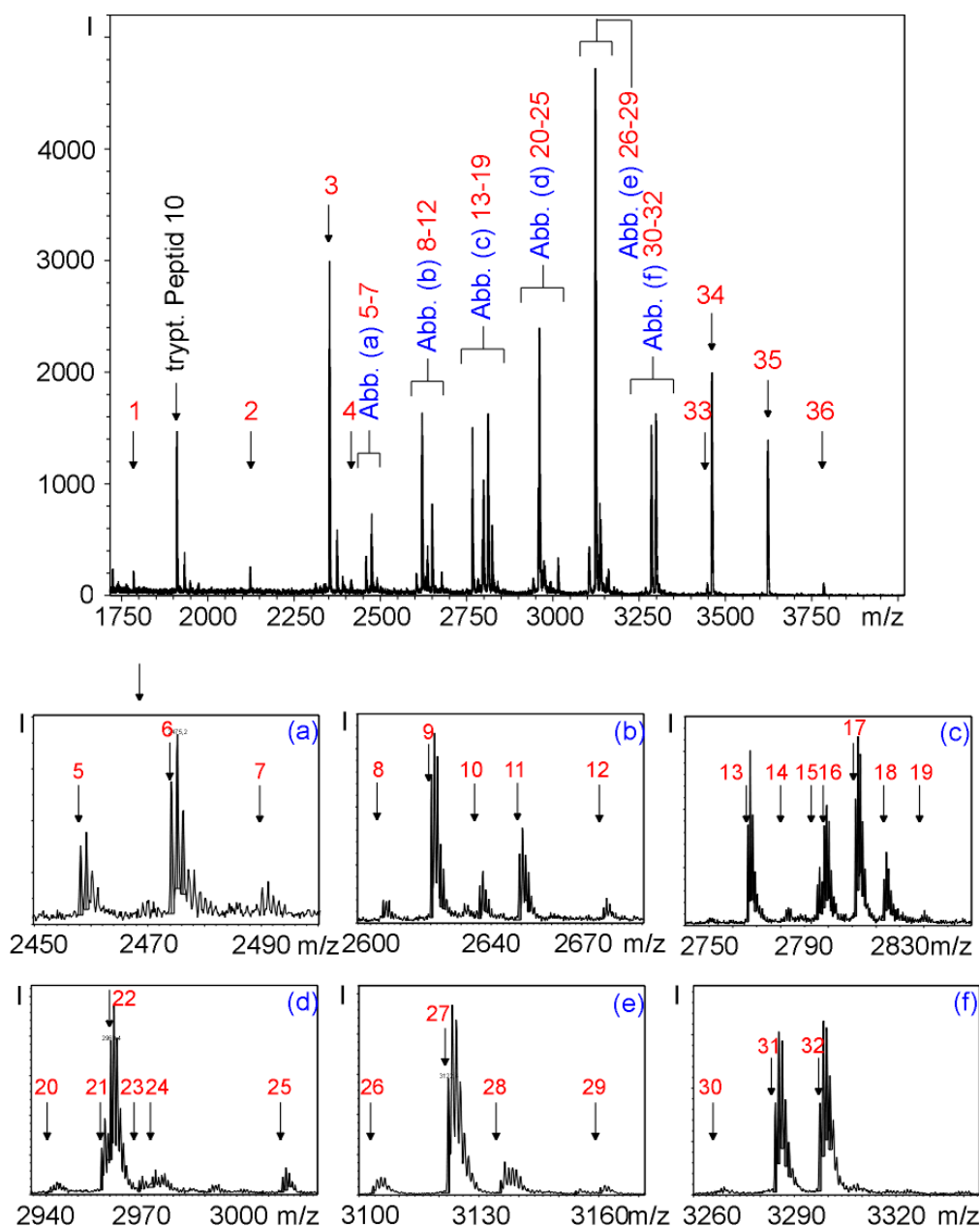
### Anhang I

Massen von Glycopeptiden des  $\beta$ -TP und ihrer Glycosylierungsstellen [M+H]<sup>+</sup>

N-Glycanstruktur	Glycosylierungsstelle	
	N1 (Asn28)	N2 (Asn56)
<i>Glc</i> Glucose, <i>Man</i> Mannose, <i>GlcNAc</i> N-Acetylglucosamin, <i>Fuc</i> Fucose, <i>Hex</i> Hexose		
Glc3Man9GlcNAc2	3932,6	4269,8
Glc2Man9GlcNAc2	3770,5	4107,8
Glc1Man9GlcNAc2	3608,5	3945,7
Man9GlcNAc2	3446,4	3783,7
Man8GlcNAc2	3284,4	3621,5
Man7GlcNAc2	3122,3	3459,5
Man6GlcNAc2	2960,3	3297,5
Man5GlcNAc2	2798,2	3135,4
Man4GlcNAc2	2636,1	2973,4
Man3Fuc2GlcNAc2	2766,2	3103,4
Man3FucGlcNAc2	2620,1	2957,4
Man3GlcNAc2	2766,2	3103,4
Man2Fuc2GlcNAc2	2604,2	2941,4
Man2FucGlcNAc2	2458,1	2795,3
Man2GlcNAc2	2312,0	2649,3
ManFuc2GlcNAc2	2442,1	2779,3
ManFucGlcNAc2	2296,0	2633,3
ManGlcNAc2	2150,0	2487,3
Fuc2GlcNAc2	2280,1	2617,3
FucGlcNAc2	2134,0	2471,2
GlcNAc2	1988,0	2325,2
GlcNAcMan5Fuc2GlcNAc2	3293,4	3639,6
GlcNAcMan5FucGlcNAc2	3147,3	3484,6
GlcNAcMan5GlcNAc2	3001,3	3338,5
GlcNAcMan3Fuc2GlcNAc2	2969,3	3306,5
GlcNAcMan3FucGlcNAc2	2823,3	3160,5
GlcNAcMan3GlcNAc2	2677,2	3014,4
GlcNAcHex4Fuc2GlcNAc2	3131,3	3468,6
GlcNAcHex4FucGlcNAc2	2985,3	3322,5
GlcNAcHex4GlcNAc2	2839,3	3176,5
Man5Fuc2GlcNAc2	3090,3	3427,5
Man5FucGlcNAc2	2944,3	3281,5

## Anhang II

*MALDI/TOF-Massenspektren und Tabellen der Glycopeptide des intra- und extrazellulären  $\beta$ -TP aus High Five und Sf21 Zellen*



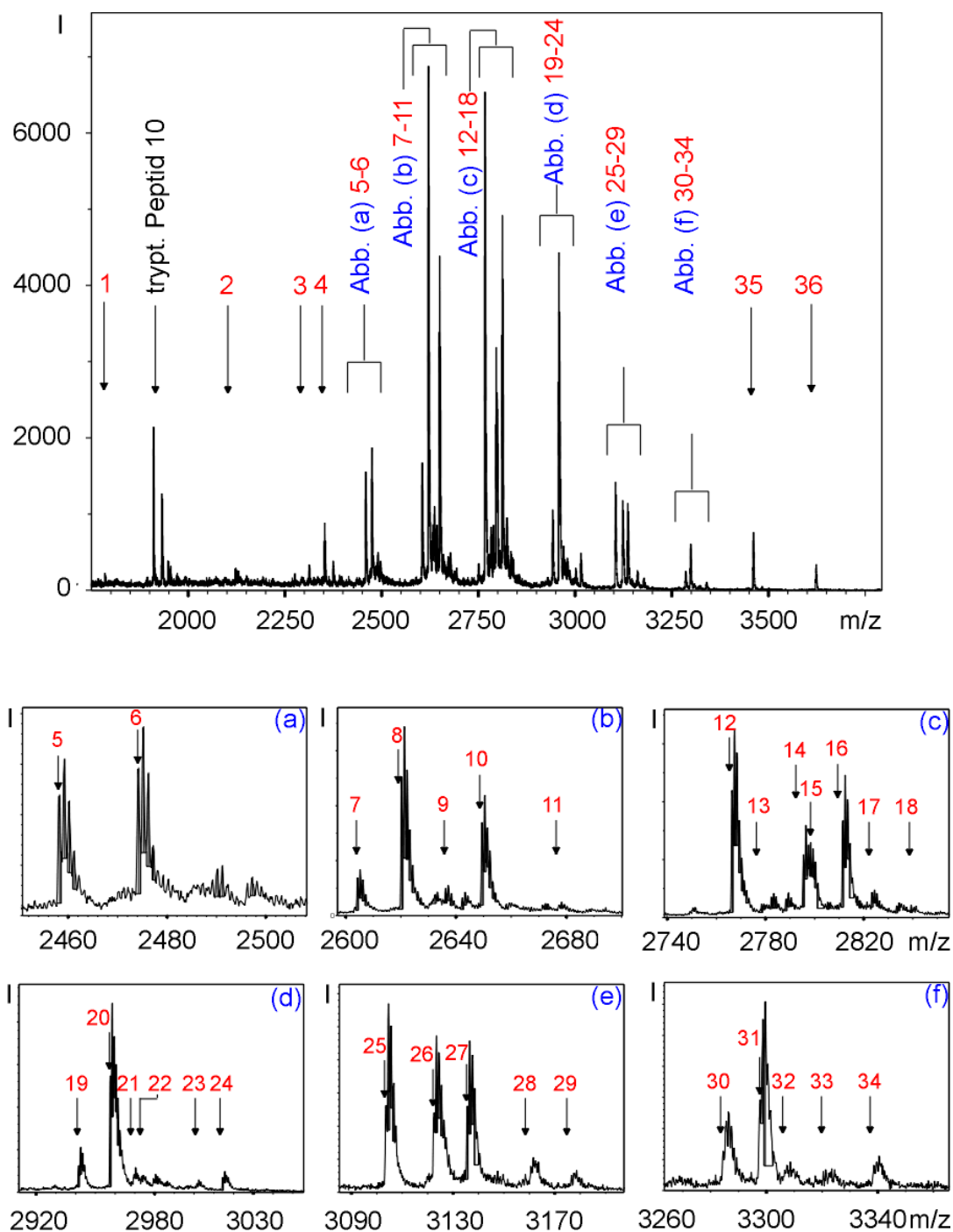
**Abb.A1.** MALDI-MS-TOF der Glycopeptidfraktion des intrazellulären  $\beta$ -TP 72 h p.i. aus High Five Zellen. Die Zahlen kennzeichnen die identifizierten Strukturen, die in Tabelle I zusammengefaßt sind. (a)-(f), Ausschnitte aus dem Hauptspektrum.

**Tab.I.** Identifizierte N-Glycane aus der Glycopeptidfraktion des intrazellulären  $\beta$ -TP aus High Five (siehe Abb.A1). Die Hauptstrukturen sind in roter Farbe hervorgehoben.

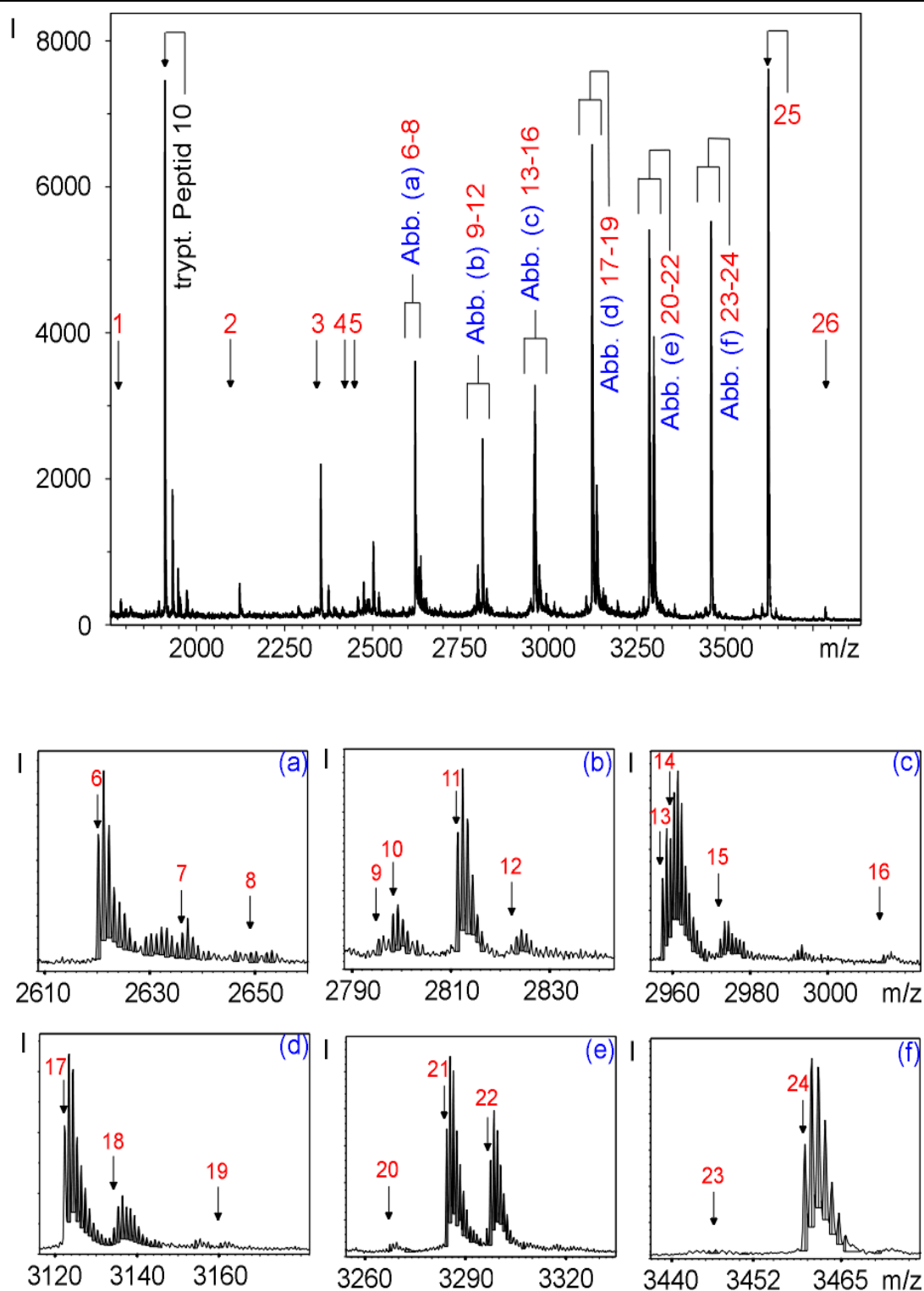
Peak Nr.	M <sub>i</sub> (Da)	N-Glycan	Peak Nr.	M <sub>i</sub> (Da)	N-Glycan
(N1/2-Glycosylierungsstelle, M Mannose, GN N-Acetylglucosamin, F Fucose, Hex Hexose)					
1	1784,9	GN-N1	19	2839,2	GNHex4GN2-N1
2	2122,2	GN-N2	20	2941,4	M2F2GN2-N2
3	2352,2	T11-Fragment	21	2957,4	M3FGN2-N2
4	2414,1	F2GN-N1	22	2960,3	M6GN2-N1
5	2458,2	M2FGN2-N1	23	2969,3	GNM3F2GN2-N1
6	2474,2	M3GN2-N1	24	2973,4	M4GN2-N2
7	2489,2	MGN2-N2??	25	3014,5	GNM3GN2-N2
8	2604,2	M2F2GN2-N1	26	3103,5	M3F2GN2-N2
9	2620,2	M3FGN2-N1	27	3122,4	M7GN2-N1
10	2636,2	M4GN2-N1	28	3135,5	M5GN2-N2
11	2649,4	M2GN2-N2	29	3160,5	GNM3FGN2-N2
12	2677,2	GNM3GN2-N1	30	3268,4	M7FGN2-N1
13	2766,4	M3F2GN2-N1	31	3284,5	M8GN2-N1
14	2780,1	MF2GN2-N2	32	3297,6	M6GN2-N2
15	2795,5	M2FGN2-N2	33	3446,5	M9GN2-N1
16	2798,3	M5GN2-N1	34	3459,6	M7GN2-N2
17	2811,4	M3GN2-N2	35	3621,7	M8GN2-N2
18	2823,3	GNM3FGN2-N1	36	3783,6	M9GN2-N2

**Tab.II.** Identifizierte N-Glycane aus der Glycopeptidfraktion des extrazellulären  $\beta$ -TP aus High Five (siehe Abb. A2). Die Hauptstrukturen sind in roter Farbe hervorgehoben.

Peak Nr.	M <sub>i</sub> (Da)	N-Glycan	Peak Nr.	M <sub>i</sub> (Da)	N-Glycan
(N1/2-Glycosylierungsstelle, M Mannose, GN N-Acetylglucosamin, F Fucose, Hex Hexose)					
1	1784,9	GN-N1	19	2941,4	M2F2GN2-N2
2	2122,2	GN-N2	20	2957,4	M3FGN2-N2
3	2311,0	M2GN2-N1	21	2969,3	GNM3F2GN2-N1
4	2352,2	T11-Fragment	22	2973,4	M4GN2-N2
5	2458,3	M2FGN2-N1	23	3001,4	GNM5GN2-N1
6	2474,2	M3GN2-N1	24	3014,5	GNM3GN2-N2
7	2604,2	M2F2GN2-N1	25	3103,5	M3F2GN2-N2
8	2620,2	M3FGN2-N1	26	3122,4	M7GN2-N1
9	2636,2	M4GN2-N1	27	3135,5	M5GN2-N2
10	2649,4	M2GN2-N2	28	3160,5	GNM3FGN2-N2
11	2677,2	GNM3GN2-N1	29	3176,6	GNHex4GN2-N2
12	2766,4	M3F2GN2-N1	30	3284,5	M8GN2-N1
13	2778,5	MF2GN2-N2	31	3297,6	M6GN2-N2
14	2795,5	M2FGN2-N2	32	3306,5	GNM3F2GN2-N2
15	2798,3	M5GN2-N1	33	3322,5	GNHex4FGN2-N2
16	2811,4	M3GN2-N2	34	3338,3	GNM5GN2-N2
17	2823,3	GNM3FGN2-N1	35	3459,6	M7GN2-N2
18	2839,2	GNHex4GN2-N1	36	3621,7	M8GN2-N2

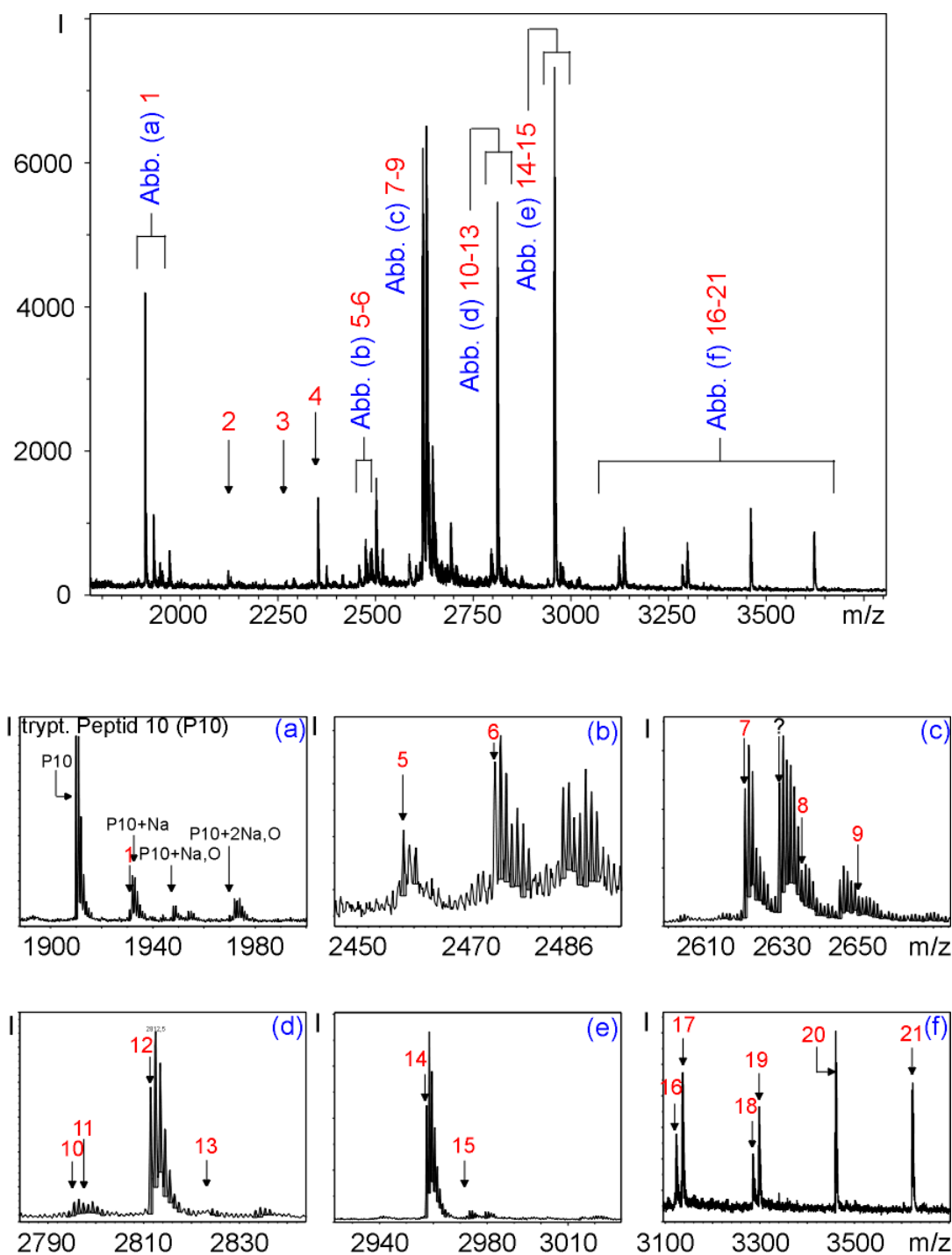


**Abb.A2.** MALDI-MS-TOF der Glycopeptidfraktion des extrazellulären  $\beta$ -TP 72 h p.i. aus High Five Zellen. Die Zahlen kennzeichnen die identifizierten Strukturen, die in Tabelle II zusammengefaßt sind. (a)-(f), Ausschnitte aus dem Hauptspektrum.



**Abb.A3.** MALDI-MS-TOF der Glycopeptidfraktion des intrazellulären  $\beta$ -TP 72 h p.i. aus Sf21 Zellen. Die Zahlen kennzeichnen die identifizierten Strukturen, die in Tabelle III zusammengefaßt sind. (a)-(f), Ausschnitte aus dem Hauptspektrum.





**Abb.A4.** MALDI-MS-TOF der Glycopeptidfraktion des extrazellulären  $\beta$ -TP 72 h p.i. aus Sf21 Zellen. Die Zahlen kennzeichnen die identifizierten Strukturen, die in Tabelle IV zusammengefaßt sind. (a)-(f), Ausschnitte aus dem Hauptspektrum.

**Tab.III.** Identifizierte N-Glycane aus der Glycopeptidfraktion des intrazellulären  $\beta$ -TP aus Sf21 (siehe Abb. A3). Die Hauptstrukturen sind in roter Farbe hervorgehoben.

Peak Nr.	M <sub>i</sub> (Da)	N-Glycan	Peak Nr.	M <sub>i</sub> (Da)	N-Glycan
(N1/2-Glycosylierungsstelle, M Mannose, GN N-Acetylglucosamin, F Fucose, Hex Hexose)					
1	1784,9	GN-N1	14	2960,3	M6GN2-N1
2	2122,2	GN-N2	15	2973,4	M4GN2-N2
3	2352,2	Fragment T11	16	3014,5	GNM3GN2-N2
4	2458,2	M2FGN2-N1	17	3122,4	M7GN2-N1
5	2474,2	M3GN2-N1	18	3135,5	M5GN2-N2
6	2620,2	M3FGN2-N1	19	3160,5	GNM3FGN2-N2
7	2636,2	M4GN2-N1	20	3268,4	M7FGN2-N1??
8	2649,4	M2GN2-N2	21	3284,5	M8GN2-N1
9	2795,3	M2FGN2-N2	22	3297,6	M6GN2-N2
10	2798,3	M5GN2-N1	23	3446,5	M9GN2-N1
11	2811,4	M3GN2-N2	24	3459,6	M7GN2-N2
12	2823,3	GNM3FGN2-N1	25	3621,7	M8GN2-N2
13	2957,4	M3FGN2-N2	26	3783,6	M9GN2-N2

**Tab.IV.** Identifizierte N-Glycane aus der Glycopeptidfraktion des exztzellulären  $\beta$ -TP aus Sf21 (siehe Abb. A4). Die Hauptstrukturen sind in roter Farbe hervorgehoben.

Peak Nr.	M <sub>i</sub> (Da)	N-Glycan	Peak Nr.	M <sub>i</sub> (Da)	N-Glycan
(N1/2-Glycosylierungsstelle, M Mannose, GN N-Acetylglucosamin, F Fucose, Hex Hexose)					
1	1931,0	FGN-N1	12	2811,4	M3GN2-N2
2	2122,2	GN-N2	13	2823,3	GNM3FGN2-N1
3	2268,1	FGN-N2	14	2957,4	M3FGN2-N2
4	2352,2	Fragment T11	15	2973,4	M4GN2-N2
5	2458,3	M2FGN2-N1	16	3122,4	M7GN2-N1
6	2474,2	M3GN2-N1	17	3135,5	M5GN2-N2
7	2620,2	M3FGN2-N1	18	3284,5	M8GN2-N1
8	2636,2	M4GN2-N1	19	3297,6	M6GN2-N2
9	2649,4	M2GN2-N2	20	3459,6	M7GN2-N2
10	2795,5	M2FGN2-N2	21	3621,7	M8GN2-N2
11	2798,3	M5GN2-N1			